

Aus der Klinik für Innere Medizin, Abteilung Kardiologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. B. Maisch

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Assoziation der dilatativen Kardiomyopathie mit den
CTLA-4-Polymorphismen CT60 und CT42**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Jana Petersen

aus Rüsselsheim

Marburg/Lahn

2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am: 20.08.2012
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund
Referent: Prof. Dr. Dr. Thomas Meyer
1. Korreferent: PD Dr. Barbara Fritz

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1. Nosologische Heterogenität der dilatativen Kardiomyopathie	1
1.2. Das cytotoxische T-Lymphozyten-Antigen-4 (CTLA-4)	8
1.2.1. Aufbau und Funktion des cytotoxischen T-Lymphozyten-Antigen-4-Gens	8
1.2.2. CTLA-4 und seine Rolle in der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen.	12
1.2.3. Bekannte Polymorphismen des CTLA-4-Gens	15
1.3. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	16
2. Material und Methoden	17
2.1. Patienten- und Kontrollkollektiv	17
2.2. Material.....	19
2.2.1. Chemikalien	19
2.2.2. Enzyme	19
2.2.3. Primer.....	20
2.2.4. Puffer.....	20
2.2.5. Reaktionsgefäße	20
2.2.6. Geräte	20
2.3. Molekularbiologische Methoden.....	22
2.3.1. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	22
2.3.2. Agarose-Gelelektrophorese	23
2.3.3. Genotypisierung der Einzelnukleotid-Polymorphismen.....	24
2.3.3.1. Denaturierende Gradientengelelektrophorese des +49-SNP	24
2.3.3.2. Restriktionsverdau-Analyse des CT60-SNP	26
2.4. Statistische Methoden	28
3. Ergebnisse	29
3.1. Untersuchung des CT60-Polymorphismus.....	29
3.1.1. PCR-Produkte des CT60-Polymorphismus.....	29
3.1.2. Restriktionsverdau-Analyse des CT60-Polymorphismus	30
3.1.3. Verteilung der Genotypen des CT60-Polymorphismus.....	31
3.1.4. Analyse des CT60-Polymorphismus im Marburger Patientenkollektiv.....	39
3.1.4.1. Gemessene Parameter in der Marburger Patientenkohorte	39
3.1.4.2. Analyse der intervallskalierten Variablen des CT60-SNP	40
3.1.4.3. Analyse der nominal- und ordinalskalierten Variablen des CT60-SNP .	47
3.1.5. Verteilung der CT60-Genotypen in Abhängigkeit des Vorhandenseins einer Autoimmunerkrankung	50

3.2. Untersuchung des +49-Polymorphismus	53
3.2.1. PCR-Produkte des +49-Polymorphismus	53
3.2.2. DGGE des +49-Polymorphismus	53
3.2.3. Verteilung der Genotypen des +49-Polymorphismus	54
3.2.4. Analyse des +49-Polymorphismus im Marburger Patientenkollektiv	56
3.2.4.1. Gemessene Parameter in der Marburger Patientenkohorte	56
3.2.4.2. Analyse der intervallskalierten Variablen des +49-Polymorphismus	58
3.2.4.4. Analyse der Assoziation kardialer Parameter mit dem +49-SNP	64
3.1.5. Verteilung der CTLA-4-+49-Genotypen in Abhängigkeit des Vorhandenseins einer Autoimmunerkrankung	68
3.2. Zusammenfassung der Ergebnisse	71
4. Diskussion	73
5. Zusammenfassung	93
6. Abstract	94
7. Literaturverzeichnis	95
8. Anhang	124
8.1. Abbildungsverzeichnis	124
8.2. Tabellenverzeichnis	127
8.3. Abkürzungsverzeichnis	128
8.4. Verzeichnis der akademischen Lehrer	131
8.6. Publikation	132
8.7. Danksagung	133

1. Einleitung

1.1. Nosologische Heterogenität der dilatativen Kardiomyopathie

Die von der WHO 1995 veröffentlichte Definition der Kardiomyopathien besagt, dass Kardiomyopathien „Erkrankungen des Herzmuskels mit kardialer Dysfunktion“ sind. Dies ist eine Erweiterung der Definition von 1980, in der die Kardiomyopathie, zur Abgrenzung gegenüber kardialer Dysfunktion durch Hypertension, ischämischer Herz-erkrankung oder Klappenschäden, noch als eine „Herzmuskelerkrankung mit unbekannter Ätiologie“ bezeichnet wurde. Die neue Definition beinhaltet also sowohl die primären Kardiomyopathien unbekannter Ursache als auch die sekundären Kardiomyopathien, die durch eine spezifische Ursache hervorgerufen werden, wie die hypertensive, valvuläre oder metabolische Kardiomyopathie (Maisch *et al.*, 2005, Richardson *et al.*, 1996) (siehe Abbildung 1).

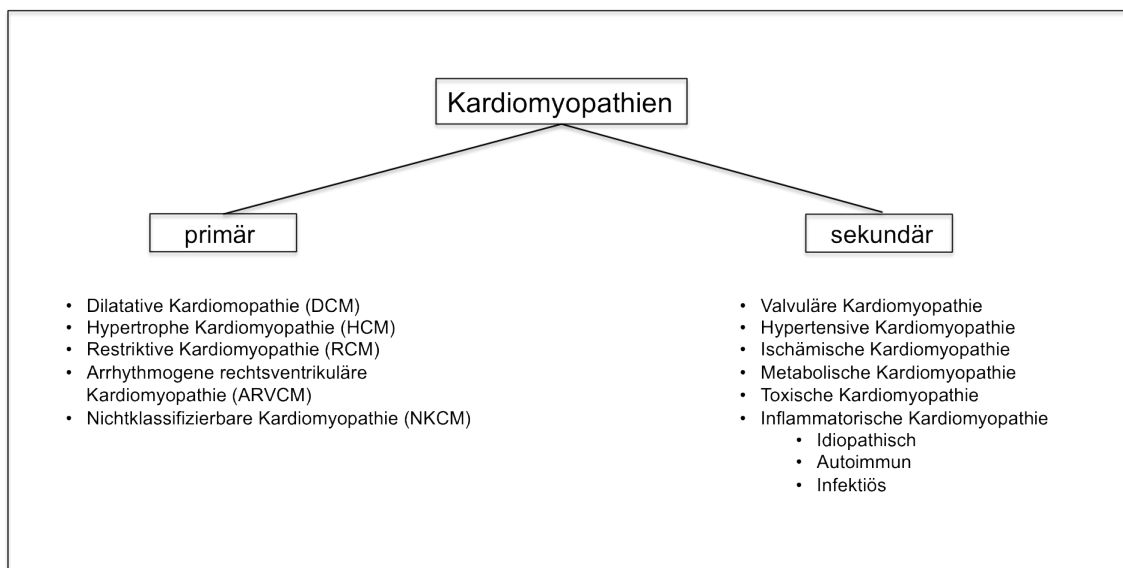


Abb. 1: Einteilung der Kardiomyopathien in primäre und sekundäre Formen nach Richardson *et al.* 1996

2008 schlug die Europäische Gesellschaft für Kardiologie eine Unterteilung der primären Kardiomyopathien vor (Elliott *et al.*, 2008). Sie sieht vor, die einzelnen primären

Kardiomyopathien – nach dem Ausschluss von Ursachen für eine sekundäre Kardiomyopathie wie koronare Herzerkrankung (KHK), Hypertonie oder Klappenvitien – in familiär/genetische und nicht-familiär/nicht-genetische Kardiomyopathien einzuteilen (siehe Abbildung 2). Der in Abbildung 2 aufgeführte Unterpunkt Erkrankungssubtyp beinhaltet für die jeweiligen Formen der Kardiomyopathien unterschiedliche bekannte genetische Ursachen. Für die dilatative Kardiomyopathie (DCM) sind hier z.B. Mutationen in Proteinen des Sarkomers, Zytoskeletts, Zellkerns und der Mitochondrien zu nennen.

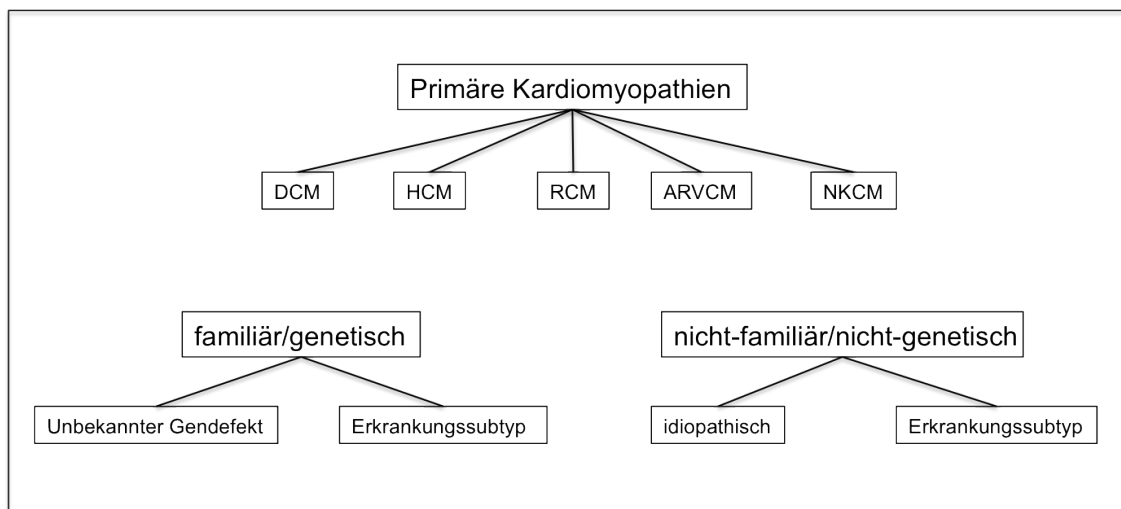


Abb. 2: Einteilung der primären Kardiomyopathien nach der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (Elliott et al., 2008). Abkürzungen siehe Abbildung 1.

Die in dieser Arbeit behandelte dilatative Kardiomyopathie ist die häufigste primäre Kardiomyopathie in Deutschland. Ihre Inzidenz liegt bei etwa 5-8 Fällen pro 100 000 pro Jahr. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die tatsächlichen Zahlen höher liegen, da asymptomatische Fälle meistens unerkannt bleiben (Paul et al., 2009). Auch ist anzunehmen, dass viele der an DCM erkrankten Patienten an einem plötzlichen Herztod sterben, ohne dass dieser Zusammenhang erkannt wird (Komajda et al., 1990).

Die DCM ist charakterisiert durch eine Dilatation des linken und teilweise des rechten Ventrikels. Aufgrund der Vergrößerung der Herzhöhlen besitzen die betroffenen Ventrikel eine verringerte Kontraktionsfähigkeit und somit eine verschlechterte Auswurfleistung. Diese führt zu einer Herzinsuffizienz, die wiederum die Symptomatik der DCM bestimmt. Hierzu gehören unspezifische Symptome, wie Schwächegefühl und Leistungsminderung, oder auch Linksherzsymptome, wie Dyspnoe, Tachykardie und Angina pectoris. Bei einer Beteiligung des rechten Herzens kommen als klinische Zeichen Aszites, Hepatomegalie und Ödeme der Extremitäten hinzu.

Die symptomatische Einteilung der DCM erfolgt daher nach den Stadien der Herzinsuffizienz, wie sie von der New York Heart Association (NYHA) definiert wurden (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Einteilung der Herzinsuffizienz nach der NYHA-Klassifikation der New York Heart Association 1994

	Definition
NYHA I	Herzerkrankung ohne körperliche Limitation. Alltägliche körperliche Belastung verursacht <ul style="list-style-type: none"> • keine inadäquate Erschöpfung • keine Rhythmusstörungen • keine Luftnot oder Angina pectoris.
NYHA II	Herzerkrankung mit leichter Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Alltägliche körperliche Belastung verursacht <ul style="list-style-type: none"> • Erschöpfung • Rhythmusstörungen • Luftnot oder • Angina pectoris.
NYHA III	Herzerkrankung mit höhergradiger Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit bei gewohnter Tätigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Geringe körperliche Belastung verursacht <ul style="list-style-type: none"> • Erschöpfung • Rhythmusstörungen • Luftnot oder • Angina pectoris.
NYHA IV	Herzerkrankung mit Beschwerden bei allen körperlichen Aktivitäten und in Ruhe. Bettlägerigkeit

Die häufigste Todesursache der DCM ist laut einer Studie von Komajda et al. die dekompenzierte Herzinsuffizienz. Seltener Komplikationen und lebensverkürzende Ereignisse der DCM entstehen durch die Beteiligung des kardialen Reizleitungssystems und die Bildung von intrakardialen Thromben in den dilatierten, in ihrer Beweglichkeit reduzierten Kammern. Störungen des Reizleitungssystems können von harmlosen Schenkelblöcken über Vorhofflimmern bis hin zu gefährlichen supraventrikulären und ventrikulären Tachykardien führen. Intrakardiale Thromben können als Embolie in Herzkranzgefäßen oder Hirnarterien letale Infarkte zur Folge haben (Komajda et al., 1990). Aufgrund der variablen Klinik beruht die Diagnose einer DCM primär auf bildgebenden Verfahren. In erster Linie wird die Echokardiographie verwendet, mit der man den linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser (LVEDD) und die Ejektionsfraktion (EF) bestimmen kann. Eine DCM gilt bei einer EF von <45% und einem LVEDD von >56 mm als gesichert, sofern keine anderen kardialen Ursachen gefunden werden (Mestroni et al., 1999). Mithilfe der Echokardiographie können

außerdem Alternativdiagnosen oder Ursachen für eine sekundäre DCM, wie z.B. Klappenvitien, ausgeschlossen werden. Zur weiteren Diagnostik gehören auch die Aufzeichnung eines Elektrokardiogramms (EKG) und eine Herzkatheteruntersuchung, um eine eventuell zu Grunde liegende koronare Herzerkrankung oder Herzrhythmusstörungen festzustellen. Während der Herzkatheteruntersuchung wird häufig zusätzlich eine Myokardbiopsie entnommen, mit deren Hilfe z.B. eine virale Beteiligung oder Systemerkrankungen, wie die Amyloidose, als Ursache einer sekundären DCM aufgedeckt werden können.

Eine DCM kann durch diverse ätiologische Faktoren ausgelöst werden, welche jedoch in 50% der Fälle nicht aufgeklärt werden können. Die DCM wird dann als idiopathisch bezeichnet (Felker *et al.*, 2000). Diesen idiopathischen Formen wird vor allem ein genetischer Hintergrund zugesprochen, weshalb sie als familiäre DCM charakterisiert werden. Definitionsgemäß bezeichnet man eine DCM als familiär, wenn sie zwei oder mehr Familienmitglieder betrifft oder ein erstgradiger Verwandter des fraglichen Patienten an einem plötzlichen Herztod in einem Alter von <35 Jahren starb (Mestroni *et al.*, 1999). Es wurden bereits Mutationen gefunden, die in der Pathogenese einiger familiärer DCM-Formen relevant sein könnten. Hierzu gehören Polymorphismen, die die Aminosäuresequenz oder den Expressionsgrad von Sarkomerproteinen, Adreno- und Acetylcholinrezeptoren, zytoskelettalen und mitochondrialen Proteinen betreffen (Taylor *et al.*, 2006, Ruppert *et al.*, 2004, Morimoto, 2008, Carniel *et al.*, 2005, Fragoso *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2008). In einer Studie von Grünig *et al.* machten Patienten mit einer familiären DCM wahrscheinlich 35% der idiopathischen DCM-Fälle aus (Grünig *et al.*, 1998).

In etwa der Hälfte der Fälle wird die Ursache der DCM aufgeklärt. Hier gelten eine virale bzw. autoimmune und toxische/alkoholtoxische Pathogenese als am häufigsten. Abbildung 3 stellt die Pathogenese einer DCM in drei Phasen dar: Auf den initialen myokardialen Schaden folgt der autoimmune myokardiale Schaden und schließlich das Endstadium der DCM (Mason, 2003).

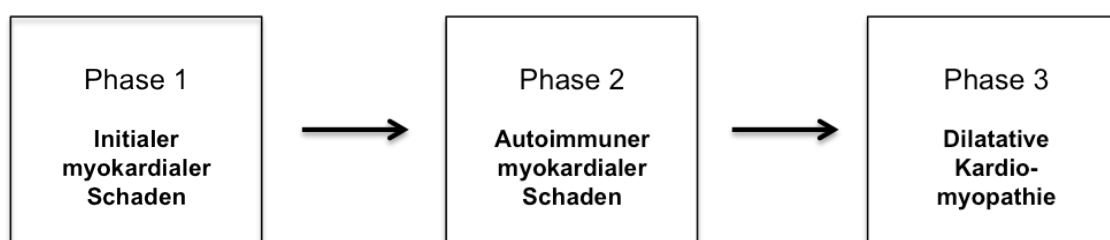


Abb. 3: Mögliche Entstehung einer dilatativen Kardiomyopathie in drei Schritten. Wahrscheinlich finden Überlappungen der drei Phasen statt (nach Mason 2003).

Der initiale myokardiale Schaden kann z.B. alkoholtoxisch, metabolisch, immunolo-

gisch oder familiär sein bzw. in Form eines viralen Infektes durch kardiogene Viren, wie Coxsackievirus B3, Parvovirus B19 (PB19), Epstein-Barr-Virus, Enteroviren oder Adenoviren, auftreten (Paul et al., 2009). Diese Viren können einen direkten zytopathischen Effekt auf das Myokard haben und somit eine akute Myokarditis in der Phase 1 bewirken. Nach dieser akuten Phase kann sich bei einigen Patienten in der Phase 2 eine autoimmun getriggerte, chronische Myokarditis mit zirkulierenden kardialen Autoantikörpern entwickeln, auch autoimmune Myokarditis genannt (Caforio et al., 2005). Typischerweise können dann antikardiale Antikörper nachgewiesen werden, die gesunde Verwandte von DCM-Patienten, teilweise schon Jahre bevor sie eine DCM entwickeln, im Blut besitzen. Ihre Existenz stellte sich in einer Studie mit 592 asymptomatischen Verwandten von DCM-Patienten als prognostischer Marker heraus (Caforio et al., 2007). Möglicherweise wird diese autoimmune Myokarditis durch antigenes Mimikry mit viralen Antigenen ausgelöst. Maisch et al. konnten *in vitro* eine Kreuzreaktion zwischen Enteroviren und Autoantikörpern gegen Herzgewebe nachweisen (Maisch et al., 1993). Eine chronische Entzündungsreaktion (siehe Abbildung 3: Phase 2) mit einhergehender dauerhafter Gewebsschädigung kann bei einigen Patienten durch fibrotischen Umbau und Kardiomyozytenuntergang in das Endstadium der DCM (siehe Abbildung 3: Phase 3) übergehen (Mason, 2003).

Da die DCM durch einen variablen klinischen Verlauf und eine vielfältige Symptomatik gekennzeichnet ist, kann man davon ausgehen, dass viele Faktoren in ihrer Entstehung eine Bedeutung haben. Dazu gehört wahrscheinlich ein großes Spektrum an molekularen und genetischen Ursachen, aber auch Umweltfaktoren wie Stress, Ernährung und körperliche Aktivität. Auch ist anzunehmen, dass sogenannte „modifier“-Gene prädisponierend in der Entstehung der DCM wirken oder auch deren Erscheinungsbild oder Verlauf beeinflussen können (Pankuweit et al., 2009). Aufgrund der in Phase 2 vorherrschenden autoimmunologischen Vorgänge wäre es denkbar, dass „modifier“-Gene im Bereich von immunregulatorischen Genen existieren, deren Einfluss den Übertritt von Phase 2 in Phase 3 ermöglicht oder beschleunigt. Die vorliegende Arbeit analysiert einen Zusammenhang zwischen einem solchen immunregulatorischen Gen, das für das zytotoxische T-Lymphozyten-Antigen-4 (CTLA-4) kodiert, und der DCM. Eine positive Assoziation könnte die Annahme stützen, dass autoimmune Vorgänge in der Pathogenese der DCM eine Rolle spielen.

Es wird angenommen, dass Autoimmunerkrankungen aus einer Unfähigkeit des Immunsystems resultieren, das Selbst zu tolerieren bzw. nicht auf dieses zu reagieren (Lesage & Goodnow, 2001, Greenwald et al., 2001). Der Körper hat zwei Hauptmechanismen, um diese Reaktion gegen sich selbst zu verhindern: die zentrale und die periphere Toleranz (Walker & Abbas, 2002).

Die Entstehung der zentralen Toleranz findet im Thymus statt. Vorläufer-T-Zellen (Thymozyten) müssen einen Reifungs- und Selektionsprozess durchlaufen, wobei Zellen, deren Rezeptoren hochaffin mit Selbstantigenen reagieren, aussortiert werden (negative Selektion). Auch Thymozyten, deren Bindungsaffinität zu MHC-I- bzw. MHC-II-Molekülen (Major histocompatibility complex) zu gering ist, werden ausgemustert (positive Selektion). Nur Thymozyten, die mit einer geringen Affinität auf Selbstantigene und Selbst-MHCs reagieren, werden selektiert und gelangen als reife T-Zellen ins Blut (Gregersen & Behrens, 2006). Somit erreichen Thymozyten, deren T-Zell-Rezeptor stark auf körpereigenes Gewebe reagieren würde, bei normaler Entwicklung nicht die Peripherie. Durch diesen Mechanismus werden zahlreiche autoimmune Reaktionen bereits verhindert. Um jedoch eine weiter reichende Selbsttoleranz zu erlangen, ist auch die periphere Toleranz nötig, besonders da trotz positiver und negativer Selektion zahlreiche autoreaktive T-Zellen in die Peripherie gelangen (Semana *et al.*, 1999).

Ein wichtiger Baustein der peripheren Toleranz sind die CD4⁺CD25⁺-T-regulatorischen-Zellen (Tregs). Tregs entwickeln sich aus T-Helfer-Vorläuferzellen durch den Einfluss von TGF- β (Chen *et al.*, 2003). Sie sind gekennzeichnet durch die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 (Fontenot & Rudensky, 2005, Fontenot *et al.*, 2005). Die Funktion dieser T-Zell-Familie ist zwar nicht in allen Details verstanden, aber es steht fest, dass sie die Aktivierung und Differenzierung von Effektor-T-Zellen reguliert (Gregersen & Behrens, 2006). Vor allem zeichnen sich Tregs durch die Inhibierung von autoreaktiven Effektor-T-Zellen aus, die für die Entstehung von Autoimmunität verantwortlich sind (Chen *et al.*, 2003). In Tiermodellen führt die Inaktivierung oder Eliminierung von Tregs zu diversen autoimmunen und entzündlichen Erscheinungen, wie Gastritis, Orchitis, Thyroiditis und spontanem autoimmunen Diabetes mellitus (Sakaguchi, 2004). Beim Menschen wird die Relevanz der Tregs für den Erhalt der peripheren Toleranz durch die seltene X-chromosomal vererbte Krankheit IPEX (Immun-Dysregulation, Polyendokrinopathie und Enteropathie, X-chromosomal) verdeutlicht (Sakaguchi, 2004). Sie tritt zusammen mit Autoimmunerkrankungen, wie Diabetes mellitus Typ 1, rezidivierenden Infektionen, Lymphadenopathie, Ekzemen und wässrig-blutigen Durchfällen, auf (Gambineri *et al.*, 2003). IPEX wird durch eine Mutation im FOXP3-Gen verursacht (Brunkow *et al.*, 2001), einem Transkriptionsfaktor, der für die Differenzierung der Tregs notwendig ist. Desweiteren konnten Barreto *et al.* zeigen, dass periphere mononukleäre Blutzellen von Patienten mit systemischem Lupus erythematodes weniger Tregs enthalten als solche von gesunden Probanden (Barreto *et al.*, 2009). Diese Erkenntnis unterstützt die Annahme, dass eine Dysfunktion oder ein Mangel an Tregs zur Entstehung einer

Autoimmunerkrankung, in diesem Fall zum systemischen Lupus erythematoses, führen kann.

Neben den Tregs existieren noch andere Bestandteile des Immunsystems, die wichtig für den Erhalt der peripheren Toleranz sind, z.B. das in der vorliegenden Arbeit behandelte cytotoxische T-Lymphozyten Antigen-4 (CTLA-4) (Gregersen & Behrens, 2006). CTLA-4 wird auf T-Zellen exprimiert und bindet Rezeptoren der B7-Familie, die auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) lokalisiert sind. CTLA-4 hemmt die Effektor-T-Zell-Aktivität und fördert die Aktivität von Tregs (Friedline *et al.*, 2009). So trägt CTLA-4 über zwei Wirkungsweisen zur peripheren Toleranz bei: erstens über die Inhibition von Effektor-T-Zellen und zweitens durch seine Rolle in der Funktion von Tregs (Gregersen & Behrens, 2006).

Da in Phase 2 der DCM-Pathogenese (siehe Seite 4 Abbildung 3) der myokardiale Schaden durch autoimmune Vorgänge entstehen kann, die zum Beispiel durch eine virale Infektion initiiert wurden, gerieten immunregulierende Gene in den Fokus der Forschung. Vor allem die humanen Leukozyten-Antigene (HLA) kristallisierten sich als Kandidatengene der DCM heraus. HLA-Moleküle spielen eine wichtige Rolle in der Immunregulation und es ist bekannt, dass ihre Mutationen protektiv oder auch prädisponierend für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen sind (Anaya *et al.*, 2006) (siehe Seite 14 Abbildung 7). Folglich könnten sie auch die Entwicklung von Immunreaktionen innerhalb des Myokards fördern. Einige Studien berichteten von einer Assoziation der DCM mit MHC-II-Antigenen, vor allem HLA-DR4 (Liu *et al.*, 2006, Rodríguez-Pérez *et al.*, 2007). Die anormale Expression von HLA-Klasse-II auf dem kardialen Endothel könnte ein wichtiger Bestandteil der autoimmunen Genese der DCM sein (Lin *et al.*, 2007). Eine Studie von Lozano *et al.* fand jedoch keine Assoziation mit HLA-DR4 (Lozano *et al.*, 1997). Lin *et al.* berichteten von einer Assoziation der DCM mit einer 14bp-Deletion in der 3'-UTR (untranslatierte Region) von HLA-G, einem nichtklassischen HLA-Klasse-I-Molekül (Lin *et al.*, 2007).

Die Erkenntnis, dass bestimmte HLA-Klasse-II-Allele eine genetische Prädisposition für die DCM darstellen, legt die Vermutung nahe, dass auch andere immunregulatorische Moleküle in der autoimmunen Pathogenese, zumindest bei einem Teil der DCM-Patienten, eine Rolle spielen können. In Mausexperimenten wurde demonstriert, dass die Manipulation von immunregulierenden Molekülen die Entwicklung einer autoimmunen Myokarditis in Mäusen fördern kann. Die Blockade von ICOS (induzierbarer T-Zell-Kostimulator) supprimiert die Entwicklung der autoimmunen Myokarditis in Mäusen (Futamatsu *et al.*, 2003), wohingegen die Blockade von PD-1/PD-L1 (programmed death-1/programmed death-1 ligand) die myokardiale Entzündung steigert (Seko *et al.*, 2007). Beides sind Immunregulatoren, die auf T-Lymphozyten exprimiert werden.

Damit übereinstimmend gaben Kishimoto *et al.* bekannt, dass die Myokarditisausprägung bei Mäusen durch T-Zellen beeinflusst werden kann (Kishimoto *et al.*, 1985). Ein anderer Immunregulator, der die Entstehung von autoimmunen Reaktionen im Myokard nach einer viralen Infektion fördern könnte, könnte das in dieser Arbeit untersuchte cytotoxische T-Lymphozyten-Antigen-4 (CTLA-4) sein.

1.2. Das cytotoxische T-Lymphozyten-Antigen-4

1.2.1. Aufbau und Funktion des cytotoxischen T-Lymphozyten-Antigen-4-Gens (CTLA-4)

Das humane CTLA-4-Gen liegt auf dem menschlichen Chromosom 2q33 zusammen mit zwei weiteren immunregulatorischen Proteinen: CD28 und ICOS (siehe Abbildung 8). Alle drei gehören der Superfamilie der Immunglobuline/Immunglobulinrezeptoren an. Zwischen CTLA-4 und CD28 besteht auf der Genebene eine 75%ige Sequenzhomologie. Beide bestehen aus zwei glykosylierten Peptidketten, die sich zu einem Homodimer zusammensetzen. Die Peptidketten von CTLA-4 umfassen je eine Transmembrandomäne und einen zytoplasmatischen Schwanz. Das CTLA-4-Gen besteht aus vier Exons, die durch Introns voneinander getrennt sind (siehe Abbildung 8). Exon 1 kodiert für das Signalpeptid, Exon 2 für die Ligandenbindungsdomäne, Exon 3 für die Transmembrandomäne und Exon 4 für den zytoplasmatischen Schwanz (Ueda *et al.*, 2003, Harper *et al.*, 1991). Das Signalpeptid, bestehend aus einer Sequenz von 37 Aminosäureresten, wird während der Biosynthese abgeschnitten und ist nicht Teil des reifen Proteins (Kristiansen *et al.*, 2000). Außer dem kompletten CTLA-4-Protein, auch fCTLA-4 (engl.: full length CTLA-4) genannt, existiert noch das lösliche CTLA-4 (engl.: soluble CTLA-4, sCTLA-4), eine alternative Spleißform, bei der durch eine Deletion von Exon 3 die Transmembrandomäne des Proteins fehlt (Magistrelli *et al.*, 1999). Ohne diese kann es nicht in die Zellmembran eingebaut werden und liegt als lösliche Form vor (Oaks *et al.*, 2000, Pawlak *et al.*, 2005).

Die Aktivierung von naiven T-Zellen hängt von zwei verschiedenen Signalen ab: erstens der Antigenerkennung über den Antigen-MHC-Komplex und zweitens der Interaktion zwischen CD28 auf der T-Zell-Oberfläche und seinen Liganden B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) auf der Antigen-präsentierenden Zelle (APC) (siehe Seite 9 Abbildung 4). Dieses zweite kostimulatorische Signal fördert die Proliferation der T-Zelle, induziert das antiapoptotische Protein Bcl-x_L und erhöht die Produktion verschiedener Zytokine, vor allem IL-2. Ohne dieses kostimulatorische Signal wird die

T-Zelle apoptotisch oder anerg (Anderson *et al.*, 1999, Bluestone, 1997, Chambers *et al.*, 1997). Da B7.1 und B7.2 nur auf der Oberfläche von APCs exprimiert werden, ist durch das kostimulatorische Signal gewährleistet, dass die Proliferation von T-Zellen nur durch professionelle APCs verursacht wird und nicht durch andere Körperzellen, die ein passendes Antigen auf ihrer Oberfläche tragen. Erkennt eine autoreaktive, naive T-Zelle in der Peripherie ihr Antigen auf der Oberfläche einer Körperzelle, entwickelt sie sich nicht zu einer Effektor-T-Zelle, da die Körperzelle mangels B7-Rezeptoren kein adäquates kostimulatorisches Signal senden kann. Dieser Mechanismus schützt vor Autoreaktivität und trägt somit zur peripheren Toleranz bei. Außer dem positiven kostimulatorischen Rezeptor CD28 kann auch ein weiterer T-Zell-Rezeptor an das B7 der APCs binden: CTLA-4 (Linsley *et al.*, 1991) (siehe Abbildung 4). Im Gegensatz zu CD28 wirkt CTLA-4 aber inhibitorisch auf die Effektor-T-Zell-Funktion (Linsley *et al.*, 1992b, Krummel & Allison, 1995).

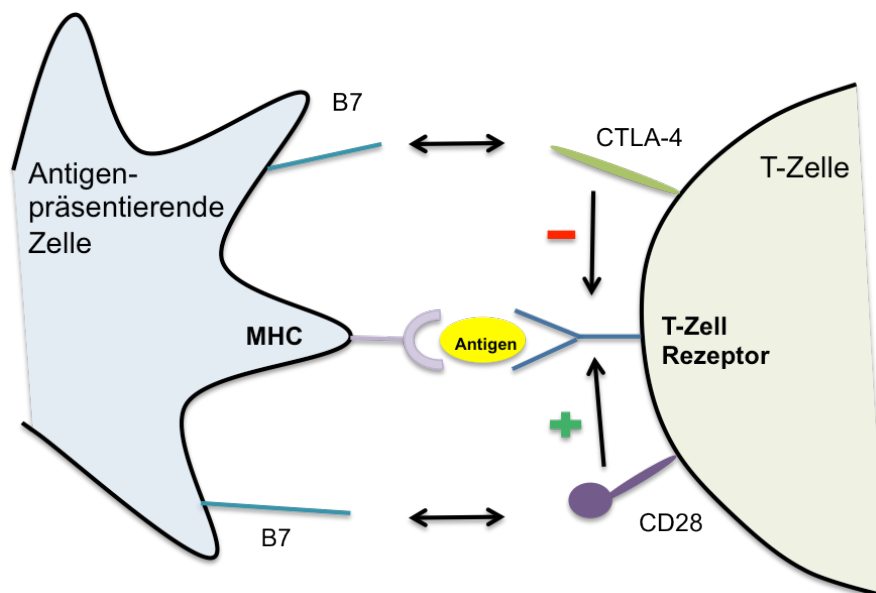


Abb. 4: Interaktionen zwischen professioneller Antigen-präsentierender Zelle und T-Zelle. Zusätzlich zur MHC/T-Zell-Rezeptor-Bindung benötigt die T-Zelle zur Aktivierung die B7/CD28-Interaktion. CTLA-4 übt nach Bindung an B7 ein inhibitorisches Signal auf die T-Zell-Funktion aus (MHC: Major Histocompatibility Complex).

CTLA-4 wird wie CD28 auf der T-Zell-Oberfläche exprimiert, jedoch anders als CD28 nicht auf ruhenden T-Zellen (Tivol *et al.*, 1996, Krummel & Allison, 1995). Kommt es zu einem Kontakt der ruhenden, naiven T-Zelle mit einer Antigen-präsentierenden-Zelle und somit zu einer Stimulation des T-Zell-Rezeptors und CD28 nennt man die T-Zelle „aktiviert“ oder auch Effektor-T-Zelle. Solche aktivierten T-Zellen exprimieren CTLA-4 mit einem Maximum von 48 Stunden nach Aktivierung (Walunas *et al.*, 1994, Krummel

& Allison, 1995, Linsley *et al.*, 1992a).

Neben der hemmenden Wirkung auf Effektor-T-Zellen spielt CTLA-4 höchstwahrscheinlich eine wichtige Rolle in T-regulatorischen-Zellen (Tregs) (Friedline *et al.*, 2009). Dieser T-Zell-Subtyp inhibiert das Immunsystem und benötigt unter anderem CTLA-4 für diese Aufgabe (Sakaguchi, 2004). Somit bewirkt CTLA-4 durch zwei Mechanismen eine Inhibition des Immunsystems: über eine Hemmung der Effektor-T-Zell-Aktivität und eine Förderung der Treg-Funktion (siehe Seite 11 Abbildung 5). Tivol *et al.* bewiesen die elementare immunregulatorische Aufgabe von CTLA-4, indem sie CTLA-4-Knock-out-Mäuse untersuchten, die durch den Funktionsverlust von CTLA-4 an Multiorganversagen durch massive Gewebedestruktion infolge einer lymphozytären Proliferation starben. In Abwesenheit von CTLA-4 werden periphere T-Zellen aktiviert und können ungehindert proliferieren, Zytokine (z.B. IL-4) produzieren und eine letale Gewebedestruktion verursachen, die vor allem das Herz und das Pankreas betrifft (Tivol *et al.*, 1995). Waterhouse *et al.* erlangten ähnliche Ergebnisse (Waterhouse *et al.*, 1995). Ob CTLA-4 seine immunregulatorische Wirkung über Tregs und Effektor-T-Zellen oder nur über Effektor-T-Zellen ausübt, ist ein Streitpunkt in der aktuellen Forschung. Diese Debatte scheint jedoch unter anderem durch neue Versuche von Peggs *et al.* zu Gunsten der dualen CTLA-4-Wirkung entschieden worden zu sein. Die Autoren versuchten, in einem Mausmodell des malignen Melanoms zu eruieren, ob die tumorsuppressive Wirkung eines blockierenden CTLA-4-Antikörpers an der Treg- oder an der Effektor-T-Zell-Funktion ansetzt. Ihre Resultate ergaben, dass eine effektive Tumorbekämpfung nur gelingt, wenn die Wirkung von CTLA-4 sowohl in Tregs als auch in Effektor-T-Zellen blockiert wird (Peggs *et al.*, 2009).

Neben der Diskussion, über welche T-Zell-Population CTLA-4 seine Wirkung entfaltet, ist noch ein weiterer Punkt nicht abschließend geklärt: Auch wenn die inhibitorische Funktion von CTLA-4 auf Effektor-T-Zellen allgemein akzeptiert wird, ist der exakte Mechanismus bislang unklar. Bis vor kurzem ging man von zwei Hauptmechanismen aus (Friedline *et al.*, 2009, Masteller *et al.*, 2000) (siehe Abbildung 5):

1. CTLA-4 konkurriert mit dem positiven kostimulatorischen Molekül CD28 um seine gemeinsamen Liganden B7.1 und B7.2 (Teft *et al.*, 2006). Da CTLA-4 eine deutlich höhere Affinität zu den B7-Rezeptoren als CD28 hat, kann es CD28 aus der immunologischen Synapse sogar verdrängen (Linsley *et al.*, 1991, Pentcheva-Hoang *et al.*, 2004). Für diese Hypothese spricht die Tatsache, dass CTLA-4 sogar ohne seinen zytoplasmatischen Schwanz hemmend auf eine Immunantwort einwirken kann (Nakaseko *et al.*, 1999). Dieser Mechanismus allein scheint die Wirkung von CTLA-4 auf Effektor-T-Zellen jedoch nicht zu erklären, da die Expression eines trunkierten CTLA-4-Rezeptors ohne zytoplasmatischen Schwanz in CTLA-4-knock-

out-Mäusen den Beginn einer lymphozytären Proliferation zwar verzögert, diese jedoch nicht vollständig verhindern kann (Masteller et al., 2000). Aus diesem Grund nimmt man an, dass

2. CTLA-4 zusätzlich eigenständig negative Signale generiert, die zu einer Inhibition der T-Zell-Proliferation und verminderten Produktion von IL-2 führen (Krummel & Allison, 1996).

Ein weiterer Mechanismus, wie CTLA-4 seine hemmende Wirkung auf das Immunsystem ausüben könnte, stellten Qureshi et al. erst kürzlich in *in vitro* und *in vivo* Experimenten vor (Qureshi et al., 2011). CTLA-4 besitzt die Fähigkeit seine Liganden, die B7-Rezeptoren, durch Transendozytose von der Oberfläche der Antigen-präsentierenden-Zellen (APC) zu entfernen. Anschließend werden die B7-enthaltenden Vesikel in den CTLA-4-exprimierenden Zellen eingeschlossen. Durch die daraus resultierende verringerte Expression von B7-Rezeptoren auf der APC ist die positive kostimulatorische Wirkung von CD28 eingeschränkt, da dieses, wie bereits beschrieben, seine Wirkung über B7 ausübt. Qureshi und Kollegen entdeckten diese CTLA-4-Wirkung auf T-Effektor-Zellen und Tregs. Daraufhin kamen sie zu dem Schluss, dass CTLA-4 nicht, wie bisher angenommen, seine inhibierende Wirkung in T-Effektor-Zellen und Tregs mechanistisch unterschiedlich ausführt, sondern auf die gleiche Weise (Qureshi et al., 2011).

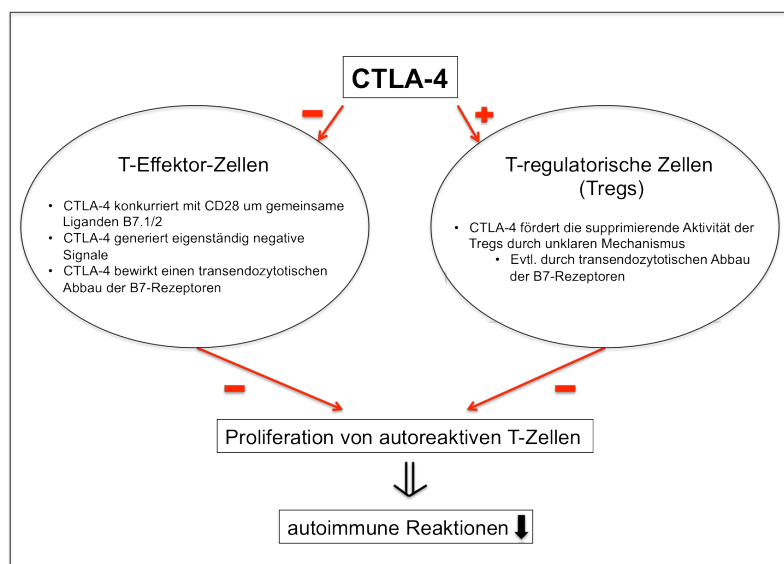


Abb. 5: Die Funktion von CTLA-4 in T-Effektor-Zellen und Tregs bewirkt über eine Hemmung der Proliferation von autoreaktiven T-Zellen ein vermindertes Auftreten von autoimmunen Reaktionen bzw. Autoimmunerkrankungen. Der genaue Mechanismus, wie CTLA-4 seine Wirkung ausübt, ist noch nicht abschließend verstanden.

1.2.2. CTLA-4 und seine Rolle in der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen

Abbildung 6 zeigt in einer schematischen Darstellung, mit welchen Mitteln das Immunsystem von Säugetieren das Gleichgewicht zwischen Toleranz gegenüber endogenen Antigenen und Immunität gegenüber eindringenden Pathogenen erhält. Mit Selbstantigenen wird das Immunsystem chronisch konfrontiert und entwickelt im Idealfall mit Hilfe von CTLA-4 und Tregs Toleranz. Einer akuten Antigenpräsentation dagegen, z.B. aufgrund einer viralen Infektion, folgt eine Aktivierung des Immunsystems über CD28 (siehe Abbildung 6).

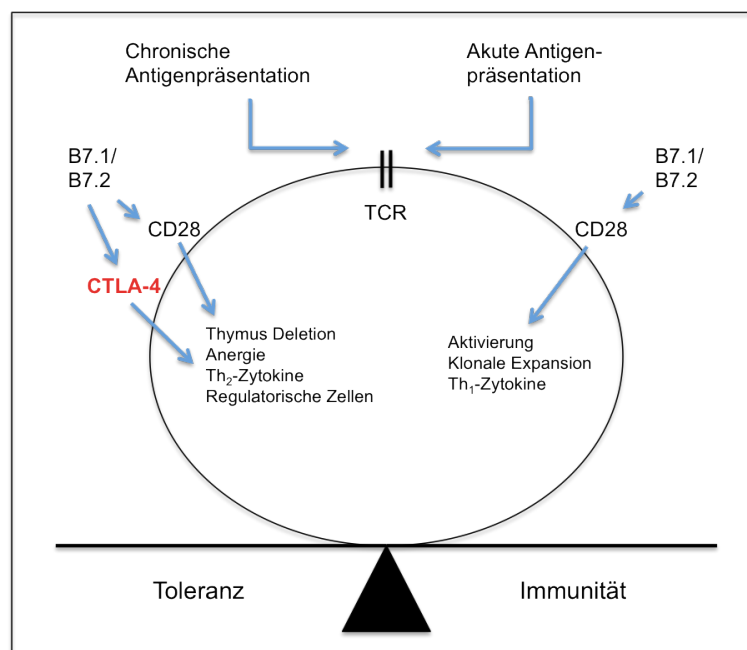


Abb. 6: Rolle von CTLA-4 im Gleichgewicht des Immunsystems zwischen Immunität durch akute Konfrontation mit einem Antigen auf der einen und Toleranz durch chronische Antigenpräsentation auf der anderen Seite. (TCR: T-Zell-Rezeptor, vereinfachtes Modell modifiziert nach Lesage and Goodnow, 2001).

Die Erkenntnis, dass CTLA-4 durch eine Hemmung der T-Zell-Antwort die periphere Toleranz erhält, begründete die Vermutung, dass ein vermindertes Expressionsniveau von CTLA-4 umgekehrt zu einer verminderten peripheren Toleranz führt und damit die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen ermöglichen könnte (Bluestone, 1997). Unterstützt wurde diese Hypothese durch Untersuchungen der Arbeitsgruppen von Perez und Greenwald, die zeigten, dass T-Zellen, die mit einem tolerogenen Stimulus gereizt wurden, Toleranz entwickeln, indem sie eine verminderte IL-2-Synthese- und Proliferationsrate aufweisen und in Phase G1 des Zell-Zyklus arretiert werden. CTLA-4-negative-T-Zellen dagegen proliferierten rege, produzierten IL-2 und traten

trotz Gabe eines tolerogenen Stimulus in die S-Phase des Zellzyklus ein (Perez *et al.*, 1997, Greenwald *et al.*, 2001). Ähnliche Resultate lieferten Versuche von Walunas und Bluestone, denn die Gabe von Anti-CTLA-4-Antikörpern an Mäuse, die mit einem tolerogenen Stimulus konfrontiert wurden, verhinderte die Toleranzentwicklung und endete in der Entstehung von Antigen-reaktiven T-Zellen (Walunas & Bluestone, 1998).

Über welche Mechanismen eine reduzierte Menge an CTLA-4 schlussendlich zu einer Autoimmunerkrankung führt, ist nicht abschließend geklärt. Es existieren jedoch, entsprechend der dualen Expressionsorte von CTLA-4, den Effektor-T-Zellen und den Tregs, zwei Hauptansätze:

1. Da die Affinität von CTLA-4 zu den B-7-Rezeptoren deutlich höher ist als die von CD28 (Linsley *et al.*, 1991), gelangte man zu der Theorie, dass bei geringer B7-Konzentration CTLA-4 gegenüber CD28 die Überhand behält und die Immunantwort der Effektor-T-Zellen hemmt (Eagar *et al.*, 2002). APCs exprimieren B7 auf ihrer Oberfläche, wenn sie mit Antigenen konfrontiert werden. Kommen sie nur mit geringen Antigenmengen in Kontakt, führt dies folglich zu einer niedrigen B7-Oberflächen-Expression und CTLA-4 bindet mit seiner hohen Affinität vermehrt an B7. In geringerer Antigenmenge liegen z.B. endogene Antigene vor, denn diese werden gewöhnlich nicht, wie z.B. replizierende Viren während einer Infektion, in größerer Menge exprimiert. In diesem Fall besitzt die APC, die der naiven T-Zelle das endogene Antigen präsentiert, nur wenige B7-Moleküle an ihrer Oberfläche, CTLA-4 verdrängt CD28 aus der immunogenen Synapse, begrenzt die Proliferation der autoreaktiven T-Zelle und verhindert so den Beginn einer autoimmunen Reaktion. Bei optimalen Aktivierungsbedingungen dagegen, wenn die APCs hohe Konzentrationen an B7 an ihrer Oberfläche tragen, überwiegt die stimulierende Wirkung von CD28 und es kommt zur vollen T-Zell-Antwort (McCoy & Le Gros, 1999). Wird CTLA-4 in verringerter Menge auf der T-Zell-Oberfläche exprimiert, kann es bei niedriger B7-Konzentration, wie sie bei endogenen Antigenen vorliegt, CD28 nicht adäquat verdrängen und somit die Expansion einer autoreaktiven T-Zelle nicht unterbinden (Tivol *et al.*, 1996).
2. Eine weitere Überlegung, wie die reduzierte Konzentration von CTLA-4 zu einer Autoimmunerkrankung führen könnte, beruht auf der wichtigen Funktion, die CTLA-4 in der Regulation der Treg-vermittelten Immunantwort innehat. Tang und Mitarbeiter wiesen nach, dass CTLA-4-blockierende Antikörper die supprimierende Aktivität von Tregs *in vitro* aufheben (Tang *et al.*, 2004a). Kolar *et al.* zeigten, dass CTLA-4-blockierende Antikörper zu vermehrtem Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) der Tregs führten (Kolar *et al.*, 2009). Damit übereinstimmend besaßen nur

CTLA-4-exprimierende Tregs die Fähigkeit, autoreaktive T-Zellen zu hemmen (Friedline *et al.*, 2009) und CTLA-4-negative-Tregs waren in Mausexperimenten unfähig, einen autoimmunen Diabetes mellitus zu verhindern (Schmidt *et al.*, 2009). Schließlich führte die Eliminierung von Tregs (Sakaguchi *et al.*, 1995) – genau wie die Gabe von Anti-CTLA-4-Antikörpern (Takahashi *et al.*, 2000) – zu Autoimmunerkrankungen in Mäusen. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass genetische Defekte, die die Funktion von Tregs beeinflussen, eventuell auch im Zusammenspiel mit Umwelteinflüssen und/oder anderen genetischen Faktoren ein Grund für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen sein können. Damit übereinstimmend zeigten Tregs von Multiple-Sklerose-Patienten im Vergleich zu gesunden Individuen eine verringerte supprimierende Aktivität (Viglietta *et al.*, 2004). Einige Forschungsgruppen konnten sogar eine niedrigere Treg-Konzentration im peripheren Blut von Patienten mit Autoimmunerkrankungen, z.B. beim systemischen Lupus erythematodes (Crispin *et al.*, 2003) und Diabetes mellitus Typ 1 (Kukreja *et al.*, 2002), im Vergleich zu gesunden Probanden nachweisen. Die Arbeitsgruppen von Li und Tang erlangten ähnliche Resultate in Studien mit DCM-Patienten (Li *et al.*, 2010, Tang *et al.*, 2010). Umgekehrt gelang eine Senkung der Mortalität von Mäusen mit experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE) von 50% auf 0% durch eine Therapie mit Tregs (Mekala & Geiger, 2005). Ähnliche Ergebnisse erreichten Tang und Kollegen mit Mäusen, die an Diabetes mellitus Typ 1 litten (Tang *et al.*, 2004b) und Morgan *et al.* mit an rheumatoider Arthritis erkrankten Mäusen (Morgan *et al.*, 2005).

Genetische Defekte, die eine Unterfunktion der Tregs und damit Autoimmunreaktionen hervorrufen, könnten beispielsweise das CTLA-4-Gen betreffen (Sakaguchi, 2004) (siehe Abbildung 7).

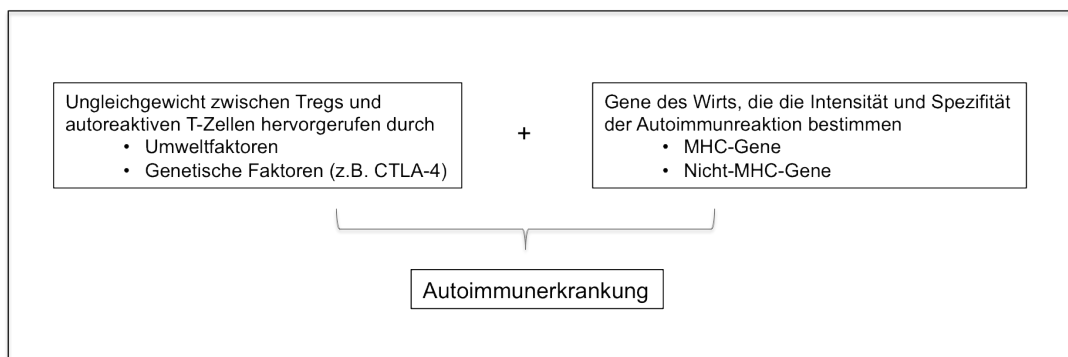


Abb. 7: Hypothetische Entstehung einer Autoimmunerkrankung durch zwei Einflussfaktoren: Fehlfunktionen der Tregs und das individuelle genetische Repertoire (verändert nach Sakaguchi 2004).

Aufgrund dieser beiden oben geschilderten Mechanismen, die zeigten, wie wichtig ein funktionelles CTLA-4 für die Immunregulation ist, gerieten Polymorphismen des CTLA-4-Gens in den Fokus wissenschaftlicher Fragestellungen. Polymorphismen könnten möglicherweise eine verminderte Expression oder eine Dysfunktion von CTLA-4 mit sich bringen und so die Prädisposition für Autoimmunerkrankungen erhöhen (Sakaguchi, 2004). Es wurde beispielsweise demonstriert, dass CTLA-4-Polymorphismen die Entwicklung und Anzahl von Tregs beeinflussen können (Tang et al., 2004a, Atabani *et al.*, 2005, Barreto et al., 2009). In den letzten Jahren entstanden eine Vielzahl von Studien, die Autoimmunkrankheiten, wie Diabetes mellitus, rheumatoide Arthritis, Hashimoto-Thyreoiditis, Morbus Basedow, systemischer Lupus erythematodes, Zöliakie, primär biliäre Sklerose und andere, auf eine Assoziation zu gängigen CTLA-4 Polymorphismen hin testeten.

1.2.3. Bekannte Polymorphismen des CTLA-4-Gens

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Polymorphismen des CTLA-4-Gens gefunden. Hierzu gehören die in dieser Arbeit untersuchten singuläre Nukleotid-Polymorphismen (SNP) +49 (CT42) und +6230 (CT60), aber auch andere, wie der -318-SNP und ein Dinukleotid-repeat-Polymorphismus (AT)_n (siehe Abbildung 8).

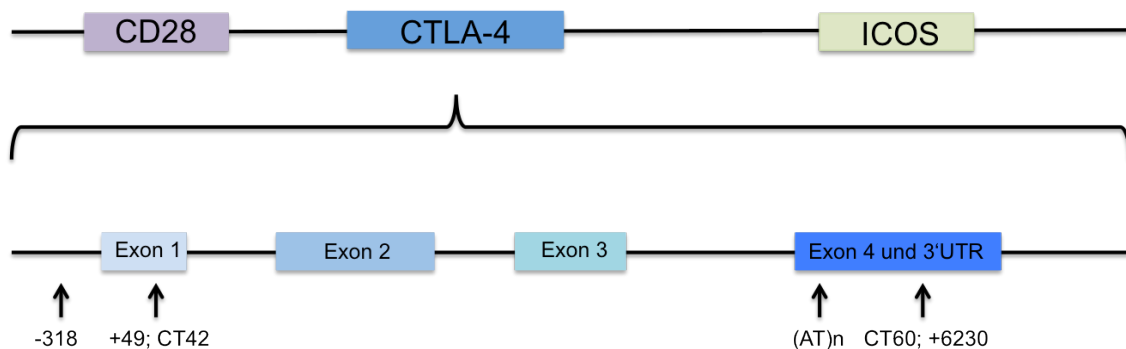


Abb. 8: Humanes Chromosom 2q33 mit den drei Genen für CD28, CTLA-4 und ICOS. Bekannte Polymorphismen des CTLA-4-Gens. (ICOS: induzierbarer Kostimulator, UTR: untranslatierte Region, Abbildung nicht maßstabsgetreu, modifiziert nach Gough et al. 2005).

Der +49-SNP, auch rs231775 oder CT42 genannt, liegt in der kodierenden Region des Exons 1 des CTLA-4-Gens. Dieses Exon kodiert die 37 Aminosäuren des Signalpeptids. Das Signalpeptid lenkt CTLA-4 zum endoplasmatischen Retikulum, wo es während der Translation abgespalten wird und somit nicht mehr Teil des reifen Proteins ist (Anjos *et al.*, 2002). Beim häufigeren A-Allel findet sich Adenin an Stelle 49

der CTLA-4-cDNA im Exon 1. Kommt es jedoch in dieser Position zum Einbau eines Guanins in den DNA-Strang und somit zum selteneren G-Allel, folgt ein Aminosäureaustausch an Stelle 17 des Signalpeptids von Threonin zu Alanin (Khatlani *et al.*, 2000). Der CT42-SNP war einer der ersten Polymorphismen im CTLA-4-Gen, der mit Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht wurde, so z.B. mit Morbus Basedow (Kouki *et al.*, 2000). Das G-Allel gilt hierbei als prädisponierend.

Der CT60-SNP, auch als rs3087243 oder +6230 bezeichnet, liegt in der 3'-untranslatierten-Region (3'-UTR) des CTLA-4-Gens. Häufiger liegt er, wie auch der +49-SNP, als A-Allel vor. Das seltenere G-Allel wurde in mehreren Studien als prädisponierend für Autoimmunkrankheiten bezeichnet.

1.3. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung einer möglichen Assoziation zwischen zwei Polymorphismen des cytotoxischen T-Lymphozyten-Antigens-4 (CTLA-4), namentlich dem CTLA-4-CT60-(+6230)- und dem CTLA-4-+49-(CT42)-Polymorphismus, und der dilatativen Kardiomyopathie (DCM). Man nimmt an, dass in der Pathogenese der DCM neben anderen Faktoren auch autoreaktive Mechanismen gegen Kardiomyozyten eine Bedeutung haben. Aus diesem Grund scheint es naheliegend, Polymorphismen von Kandidatengenen im Bereich der Immunregulation auf eine Assoziation zur DCM hin zu untersuchen. Hierzu gehört der auf T-Lymphozyten exprimierte Immunregulator CTLA-4. In der vorliegenden Dissertationsschrift soll erstens analysiert werden, ob bestimmte Genotypen des CTLA-4-CT60- und +49-Polymorphismus gehäuft bei DCM-Patienten im Vergleich zu Gesunden auftreten und zweitens, ob der Genotyp der beiden CTLA-4-Polymorphismen einen Einfluss auf die Klinik und den Verlauf der DCM hat. Sollte einer dieser beiden Zusammenhänge bestehen, könnte dies die Annahme unterstützen, dass autoimmune Vorgänge in der Entwicklung von bestimmten Subentitäten der DCM eine Rolle spielen.

2. Material und Methoden

2.1. Patienten- und Kontrollkollektiv

In die vorliegende klinische Studie flossen die Daten von Patienten aus dem Kompetenznetz Herzinsuffizienz (KNHI) ein. Es handelt sich hierbei um eine seit 2003 bestehende deutschlandweite Kooperation mit Leitstelle in Berlin, der auch die Kardiologische Klinik der Universität Marburg angehört. Die Kontrollgruppe wurde aus klinisch gesunden Personen ohne Hinweise auf eine Herzinsuffizienz in Anamnese und körperlicher Untersuchung gebildet, die als Blutspender in die Marburger Blutbank gekommen waren. Die Rekrutierung der 457 kardiologischen Patienten erfolgte auf den internistischen Stationen des Universitätsklinikums Marburg, beziehungsweise des Universitätsklinikums der Charité Berlin. Die Patienten hatten klinische Zeichen der Herzinsuffizienz und wurden zur medizinischen Ursachensuche stationär eingewiesen. Die diagnostischen Kriterien der dilatativen Kardiomyopathie wurden definiert als echokardiographisch ermittelte linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF) von $<45\%$ und/oder einem linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser (LVEDD) von >56 mm ohne das Vorliegen von sekundären Ursachen für eine Herzinsuffizienz wie etwa koronare Herzerkrankung oder signifikante Vitien. Die Patienten wurden routinemäßig zu ihrer persönlichen und familiären Anamnese befragt, einer körperlichen Untersuchung unterzogen und mittels eines 12-Kanal-Elektrokardiogramms, einer Röntgen-Thorax-Untersuchung und einer transthorakalen Echokardiographie untersucht. Um eine relevante koronararterielle Stenose auszuschließen, wurden die DCM-Patienten einer diagnostischen Koronarangiographie unterzogen. Patienten, die die diagnostischen Kriterien der dilatativen Kardiomyopathie erfüllten, wurden eingeladen an der Studie teilzunehmen. Als Voraussetzung zur Teilnahme mussten sie außerdem eine schriftliche Einwilligung unterzeichnen.

In Marburg wurden 250 Probanden der Patientengruppe in die Studie eingeschlossen und nach etwa 12 Monaten im Sinne eines Follow-Ups erneut mittels Anamnese, körperlicher Untersuchung, 12-Kanal-Elektrokardiogramm, Röntgen-Thorax und transthorakaler Echokardiographie nachuntersucht. Außerdem wurde eine Myokardbiopsie entnommen, die immunhistologisch und molekularbiologisch analysiert wurde, um Aufschluss über die Ätiologie der DCM geben zu können. Die 250 DCM-Patienten aus Marburg wurden, je nach Zeitpunkt ihres Einschlusses in die Studie, in zwei Gruppen

aufgeteilt: DCM Marburg 1 und DCM Marburg 2. In der vorliegenden Arbeit wurde der CTLA-4-CT60-Polymorphismus in beiden Marburger DCM-Gruppen untersucht. Der CTLA-4-CT42-Polymorphismus in der DCM-Gruppe Marburg 1 wurde bereits in der Dissertationsschrift von Clarissa Struwe mit dem Titel „Assoziationsuntersuchung bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie und Polymorphismen im CTLA4-Gen“ eingehend analysiert (Struwe, 2012). Aus diesem Grund wurde er in dieser Arbeit nur in der DCM-Gruppe Marburg 2 bearbeitet, damit die Ergebnisse von Clarissa Struwe in einer zweiten Gruppe verifiziert werden konnten.

Die übrigen 207 DCM-Patienten wurden in der Kardiologischen Klinik der Charité Berlin rekrutiert. Bei diesen Probanden wurde kein Follow-Up durchgeführt und an Daten nur Alter, Geschlecht, LVEDD und EF erhoben. Diese Berliner DCM-Patienten wurden nur für den CTLA-4-CT60-Polymorphismus untersucht, für den +49-SNP erfolgte dies bereits durch Clarissa Struwe.

Von jedem Probanden wurde mittels venöser Punktion Blut in ein EDTA-Antikoagulanz-enthaltendes Röhrchen entnommen. Hieraus wurde DNA für die molekularen biologischen Versuche dieser und anderer Arbeiten gewonnen. Durchgeführt wurde die DNA-Isolierung von den kardiologischen Abteilungen der Universität Marburg bzw. der Charité Berlin.

Für die Untersuchung des CTLA-4-CT60-Polymorphismus wurden die Daten aller 457 Patienten und 534 Kontrollen miteinander verglichen. Für die statistischen Untersuchungen des CTLA-4-+49-Polymorphismus wurden Daten von 152 DCM-Patienten und 221 Kontrollindividuen verwendet, die nicht in die Arbeit von Clarissa Struwe eingingen. So konnten die von Clarissa Struwe erzielten Ergebnisse mit einer zusätzlichen Patienten- und Kontrollgruppe in der vorliegenden Arbeit überprüft und eine umfassende Bewertung der Signifikanz des CTLA-4-+49-Polymorphismus in Bezug auf die DCM erzielt werden.

Das Studienprotokoll wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Marburg und der des Universitätsklinikums der Charité Berlin genehmigt.

2.2. Material

2.2.1. Chemikalien

	Firma	Standort
Acetat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Agarose	Biozym	Oldendorf, Deutschland
Amoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Aqua dest.	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Borsäure	Acrós	Geel, Belgien
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs	Frankfurt, Deutschland
Desoxyribonukleosid-triphosphate (100mM)	Bioline	Luckenwalde, Deutschland
DNA-Längenstandard	Roche	Mannheim, Deutschland
EDTA	Acrós	Geel
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Formamid	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Merck	Darmstadt
Probenpuffer	Prime5	Hamburg
MgCl ₂ -Lösung (50 mM)	Bioline	Luckenwalde
NE-Puffer 4	New England Biolabs	Frankfurt
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Pharmacia Biotech	Uppsala, Schweden
PCR-Puffer	Bioline	Luckenwalde
Rotiphoese Gel (Acrylamid)	Roth	Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan	Acrós	Geel
Urea (Harnstoff)	Bio-Rad Laboratories	München, Deutschland

2.2.2. Enzyme

	Firma	Standort
BIOTAQ™ DNA Polymerase	Bioline	Luckenwalde
NlaIII	New England Biolabs	Frankfurt

2.2.3. Primer

	Sequenz	Firma	Standort
CTLA-4-CT42-Polymorphismus	5'-GGATCCTGAAAGGTTTTGCTC-3' und 5'-(GxCy) _n -TGCTGAAACAAATGAAACCC-3' ((GxCy) _n steht für die 51bp lange GC-Klammer)	Invitrogen	Darmstadt
CTLA-4-CT60-Polymorphismus	5'-ATCTGTGGTGGTCGTTTTCC und 3'-AGATCAAAATGGCTGCAAGG	Tib Molbiol	Berlin, Deutschland

2.2.4. Puffer

	Zusammensetzung
50xTAE-Puffer	2 M Tris, 1 M Acetat, 0,5 M EDTA, 50 mM KOH, pH 8,0
10xTBE-Puffer	1 M Tris, 0,9 M Borsäure, 0,01 M EDTA, pH 8,4
10xPCR Puffer	160 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 670 mM Tris-HCl, pH 8,8

2.2.5. Reaktionsgefäße

	Firma	Standort
0,2 ml Tubes Plastikbrand	Kobe	Marburg, Deutschland
96 Multiply PCR Platte natur 0,2 ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland

2.2.6. Geräte

	Firma	Standort
DGGE-Apparat Universal Mutation Detection System und Zubehör	Bio-Rad Laboratories	München
Elektrophoresekammer Sunrise	Biometra	Göttingen, Deutschland
Elektrophoresekammer GNA 100	Pharmacia Biotech	Uppsala
GPKR Zentrifuge	Beckmann Coulter	Krefeld, Deutschland
Mikrowelle	AFK Deutschland	Hamburg

Minizentrifuge MCF-2360	LMS (Laboratory & Medical Supplies)	Kaiserslautern, Deutschland
Mischer Reax control	Heidolph	Schwabach, Deutschland
Pipetten (10 µl – 1000 µl)	Eppendorf	Hamburg
Stromquelle Standard Power Pack P25	Biometra	Göttingen
Thermocycler Primus 96 plus	Aviso	Jena, Deutschland
Transilluminator	Bio-Rad Laboratories	München
Waage	Sartorius	Göttingen
Wärmeplatte MR 3001	Heidolph	Schwabach
Wärmeschrank	Heraeus	Hanau, Deutschland

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine von Kary Mullis entwickelte Methode (Mullis *et al.*, 1986) zur Amplifizierung von DNA-Abschnitten. Um eine bestimmte DNA-Sequenz vervielfältigen zu können, wurden hier spezifische Oligonukleotide, sogenannte Primer, als Startermoleküle verwendet, die den gewünschten DNA-Abschnitt des CTLA-4-Gens einrahmen. Zur Amplifikation waren drei Vorgänge nötig, die jeweils 35- bis 40-Mal wiederholt wurden: Denaturierung, Anlagerung der Primer (Annealing) und Synthese (Verlängerung, engl.: Elongation). Bei der Denaturierung wurde der DNA-Doppelstrang durch Erhitzen reversibel in seine beiden Einzelstränge aufgespalten. Während des zweiten Vorganges, dem Annealing, lagerten sich die Primer an ihre komplementären Sequenzen an der DNA an und bestimmten so den Ansatzpunkt der DNA-Polymerase, die im dritten Schritt, der Synthese, die Primer mit Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) verlängerte. Die Reaktion lief in einem Thermocycler ab, der zyklisch die Temperaturoptima der drei Vorgänge einstellt und so die richtige Abfolge der Schritte gewährleistet. Durch die Wiederholung des Zyklus kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der Zielsequenz.

Zur Amplifikation der erwünschten DNA-Abschnitte wurde 1 µl der zu untersuchenden DNA mit dem in Tabelle 2 aufgeführten PCR-Ansatz vermischt:

Tabelle 2: Komponenten des PCR-Ansatzes für den Master-Mix

	Volumen in µl (pro 1 µl DNA)
Aqua dest.	8,44
PCR Puffer	1,25
dNTP Mix	1,00
MgCl₂-Lösung	0,50
Primer R	0,38
Primer F	0,38
DNA-Polymerase	0,06

Die Ansätze wurden in die PCR-Platten pipettiert, mit dem Vortexer geschüttelt, zentrifugiert und in den Thermocycler gestellt. Dazu wurde das in Tabelle 3 angegebene PCR-Protokoll verwendet:

Tabelle 3: PCR-Zyklen

	Zeit	Temperatur
Denaturierung	10,5 min	95 °C
35 Zyklen	30 s - 30 s - 45 s	95 °C – 61 °C – 72 °C
Extension	7 min	72 °C
Abkühlung	~	4 °C

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.3.2.) konnten die PCR-Produkte überprüft und dargestellt werden.

2.3.2. Agarose-Gelelektrophorese

In der vorliegenden Arbeit wurden Gelelektrophoresen durchgeführt, um einerseits zu überprüfen, ob das jeweilige PCR-Produkt korrekt amplifiziert wurde, und um andererseits den Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) des CT60-SNP zu analysieren. Die Agarose-Gelelektrophorese wurde als eine Methode zur Trennung und Identifizierung von DNA-Molekülen eingesetzt. Sie basiert auf der Tatsache, dass negativ geladene DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld Richtung Anode wandern. Das Agarose-Gel befand sich in einer mit einer Pufferlösung (TBE-Puffer) gefüllten horizontalen Kammer. Um die für die Agarosekammer gewünschte Konzentration von 0,5xTBE-Puffer zu erlangen, wurde der 10xTBE-Puffer 20fach verdünnt. Die Geschwindigkeit, mit der die DNA-Moleküle durch das Agarose-Gel wanderten, ist von verschiedenen Faktoren abhängig: der Konzentration und damit der Porengröße des Agarose-Gels, der angelegten Spannung und der Größe und Konformation der DNA. Bei konstanter Porengröße und angelegter Spannung ist die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle in einem bestimmten Bereich bekanntermaßen umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts. Neben den DNA-Proben wurde in einer getrennten Bahn ein Längenstandard, ein 100 Basenpaar-Marker, aufgetragen, damit die Größe der PCR-Produkte aufgrund ihrer Wanderungstrecke ermittelt werden konnte.

Zur Herstellung der Agarose-Gele wurde 1,5 g Agarose (1,5%-ig) pro 100 ml TBE-Elektrophorese-Puffer verwendet. Zunächst löste man die Agarose unter Erwärmen in TBE-Puffer und gab anschließend 15 µl Ethidiumbromid pro 100 ml Puffer in das abgekühlte Gemisch. Nach Bestückung mit einem Kamm zur Taschenbildung wurde die Gelwanne mit der noch heißen Agarose-TBE-Lösung befüllt. Sobald das Gel auf Raumtemperatur abgekühlt war, konnte der Kamm entfernt und die Gelwanne in die

mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt werden. Die Taschen wurden mit jeweils 5 µl der PCR-Produkte und 2 µl des Probenpuffers (Prime5), einer Negativkontrolle aus destilliertem Wasser und einem Längenstandard gefüllt. Nachdem das Gel bei 80-120 mA etwa 2 Stunden gelaufen war, konnte die mit Ethidiumbromid interkalierten PCR-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden und zur Dokumentation photographiert werden.

2.3.3. Genotypisierung der Einzelnukleotid-Polymorphismen

Zur Darstellung der Einzelnukleotid-Polymorphismen wurden in dieser Studie zwei verschiedenen Methoden angewendet. Der CTLA-4-+49-Polymorphismus des Exons 1 wurde mit Hilfe der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) und der CT60-Polymorphismus mittels einer Restriktions-Analyse untersucht. Einige Proben wurden zum Sequenzieren an die Firma Seqlab in Göttingen geschickt, um zu verifizieren, dass durch die Genotypisierung mittels DGGE und Restriktionsverdau korrekte Ergebnisse hervorgebracht wurden.

2.3.3.1. Denaturierende Gradientengelelektrophorese des +49-SNP

Die denaturierende Gradientengelelektrophorese beruht auf unterschiedlichen Schmelzcharakteristiken mittels PCR hergestellter DNA-Fragmente. Bereits Mutationen eines einzelnen Nukleotids können, wie in der vorliegenden Arbeit, veränderte Denaturierungseigenschaften der DNA bewirken. Beim Gießen des DGGE-Gels wurde ein Gradient aus denaturierendem Agens (z.B. Formamid, Harnstoff) hergestellt, durch den die DNA-Proben wanderten. Je nach DNA-Sequenz kam es an einer bestimmten Höhe im Gel zur teilweisen Dissoziierung der DNA-Doppelstränge. Der Zusammenhalt des Doppelstrangs wurde durch das Vorhandensein von Guanin/Cytosin-reichen Sequenzen aufrechterhalten. Je mehr Guanin/Cytosin-Bindungen im PCR-Amplifikat vorhanden waren, desto später im Gel kam es zur Dissoziation. Hierdurch verlangsamte sich die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Stränge stark, die dann als DNA-Bande sichtbar wurden. Für die verschiedenen DNA-Sequenzen entstanden so spezifische Bandenmuster, die durch Zugabe von Ethidiumbromid unter UV-Licht dargestellt werden konnten. In der DGGE-Analyse findet man bei Homozygoten eine einzelne Bande, während man bei heterozygoten Trägern 2 bis 4 verschiedene Banden erkennen kann. Um auch noch DNA-Sequenzen voneinander trennen zu können, die erst bei hohen Konzentrationen an denaturierendem Agens schmelzen würden, wird wäh-

rend der PCR eine Guanin/Cytosin(GC)-reiche Sequenz, die sogenannte GC-Klammer, im Primer angehängt. Sie verhindert, dass sich die DNA-Stränge schon vor Erreichen ihrer spezifischen Schmelzstelle im Gel in Einzelstränge auftrennen. Im Falle des in dieser Arbeit bearbeiteten CTLA-4-CT60-Polymorphismus hat die GC-Klammer eine Länge von 51 Basenpaaren. Fischer und Lerman publizierten das Verfahren der DGGE 1983 als erste Arbeitsgruppe (Fischer & Lerman, 1983).

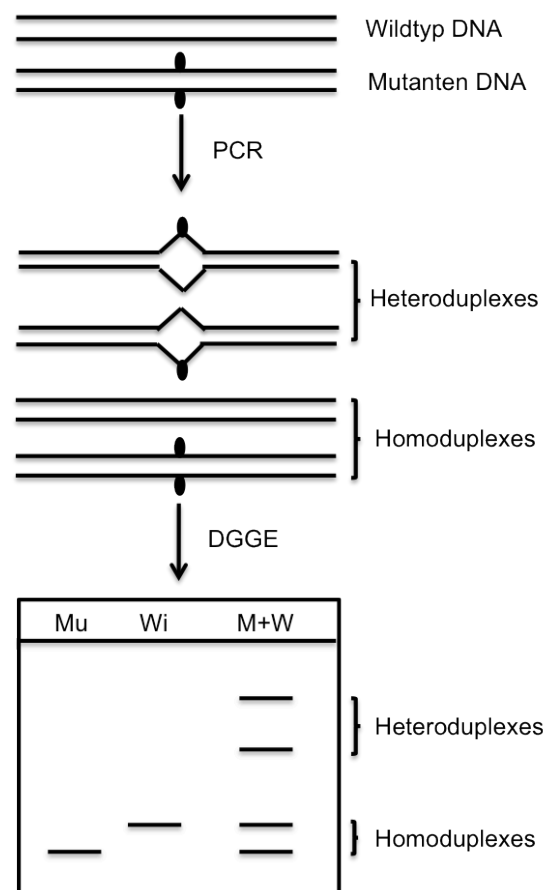


Abb. 9: Schematische Darstellung des Mutationsnachweises mittels DGGE-Technologie (Mu: Mutanten-DNA, Wi: Wildtyp-DNA).

Für die Fertigung des DGGE-Gels wurden zwei unterschiedlich stark konzentrierte Lösungen benötigt, die beim Gießen des Gels mit Hilfe des Gradientenmischers einen gleichmäßigen Gradienten aus denaturierenden Agenzien, in diesem Fall Formamid und Harnstoff, bildeten. Die Mischungsverhältnisse sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: DGGE-Lösungen

	0% Lösung	80% Lösung
40% Rotiphorese Gel (Acrylamid)	40,0 ml	40,0 ml
87% Glycerin	4,6 ml	4,6 ml
50x TAE-Puffer	4,0 ml	4,0 ml
Formamid		64,0 ml
Urea		67,2 g
H₂O	auf 200 ml auffüllen	auf 200 ml auffüllen

Eine Spritze des Gradientenrades wurde mit 5 ml 80%iger und 15 ml 0%iger Lösung und die Zweite entsprechend mit 15 ml 80%iger und 5 ml 0%iger Lösung gefüllt, um einen Gradienten zwischen 20% und 60% zu erreichen. Zur Festigung des Acrylamidgels wurde 18 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) und 180 µl Ammoniumperoxodisulfat (APS) untergemischt. Nun spritzte man die Gele mit Hilfe des Gradientenrades gleichmäßig zwischen zwei vorher sorgfältig mit Ethanol gereinigte und durch einen Spacer von einander getrennte Glasplatten. Ein eingelegter Kamm diente der Taschenbildung. Nach der Polymerisation des Gels wurde es in eine Halteeinrichtung eingeklemmt und in die mit 60°C warmem 1xTAE-Puffer gefüllte DGGE-Wanne gestellt. Der Kamm wurde entfernt und 5 µl PCR-Produkt wurde mit 2 µl Probenpuffer vermischt und in die einzelnen Taschen pipettiert. Das Gel wurde erst 5 Minuten bei 130 V, dann 15 bis 16 Stunden bei 60 V gefahren. Zur Auswertung wurde das Gel anschließend in Ethidiumbromid gebadet, wodurch die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar wurden.

2.3.3.2. Restriktionsverdau-Analyse des CT60-SNP

In der vorliegenden Arbeit wurden Restriktionsendonukleasen eingesetzt, um DNA-Stränge sequenzspezifisch zu schneiden. Zur Bestimmung des CTLA-4-CT60-Polymorphismus wurde das Enzym *Nla*III verwendet, welches die DNA an der Nukleotidabfolge 5'-CATG-3' schneidet und so aus einem langen Strang mehrere unterschiedlich kurze DNA-Stücke herstellt. Entsteht nun durch eine Punktmutation eine zusätzliche Erkennungssequenz oder fällt eine Schnittstelle weg, nennt man diese Mutation einen Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP). Im vorliegenden Fall führte der RFLP dazu, dass es zur Bildung von sechs anstelle von vier DNA-Fragmenten kam, die sich als spezifische Banden auf dem Agarosegel darstellen ließen, so dass der Genotyp des Probanden direkt bestimmt werden konnte.

Für die Durchführung der Restriktionsverdau-Analyse wurden die in Tabelle 5 angegebenen Volumina für einen Ansatz hergestellt:

Tabelle 5: Restriktionsverdau-Ansatz

	Volumen in μl (pro 5 μl PCR-Produkt)
Enzym NlaIII	0,30
BSA	0,15
NE-Puffer 4 (50 mM Kaliumacetat, 20 mM Tris-Acetat, 10 mM Magnesiumacetat, 1 mM DTT; pH 7,9)	1,50
H₂O	8,05

Anschließend wurde 5 μl PCR-Produkt hinzugegeben, die Probe gut vermischt und zentrifugiert. Im Brutschrank mussten die Proben nun mindestens vier Stunden bei 37°C inkubiert werden. Die Herstellung des Agarosegels für die RFLP-Analyse erfolgte wie in Abschnitt 2.3.2. beschrieben. Für den Enzymverdau war lediglich ein höher konzentriertes Gel von Nöten, als es für die normale Gelelektrophorese der Fall war. Es wurde ein 3 %-iges Gel hergestellt mit 3 g Agarose pro 100 ml TBE-Puffer. Die Proben wurden mit jeweils 8 μl Probenpuffer in die Geltaschen pipettiert. Auch hier wurden zusätzlich eine Negativkontrolle mit unverdaulichem PCR-Produkt und ein Längensstandard aufgetragen. Das Gel ließ man je nach Größe bei 120-140 V für 2-5 Stunden laufen und legte es anschließend unter UV-Licht, um die entstandenen DNA-Banden beurteilen und dokumentieren zu können.

2.4. Statistische Methoden

Die Allel- und Genotypverteilung der CTLA-4-+49- und CT60-Polymorphismen in den Kontroll- und Patientengruppen wurden durch direkte Zählung ermittelt. Hierbei traten Unterschiede zwischen den Gruppen auf, die mittels statistischer Verfahren darauf überprüft wurden, ob es sich um zufallsbedingte (Nullhypothese H_0) Unterschiede handelte oder nicht (Alternativhypothese H_1). War der Unterschied nicht zufallsbedingt, wurde die Alternativhypothese angenommen und damit eine Assoziation zwischen dem untersuchten Merkmal und der Gruppe, in dem dieses häufiger auftrat, zum Beispiel dem CTLA-4-+49-GG-Polymorphismus bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, vermutet. Um einzuschätzen, wie hoch die Irrtumswahrscheinlichkeit ist, wenn man die Nullhypothese ablehnt, wurde mit Hilfe von statistischen Tests der p-Wert berechnet. Ist dieser niedriger als das vorher festgelegte Signifikanzniveau, kann man die Nullhypothese verwerfen, die Alternativhypothese annehmen und das Ergebnis somit als statistisch signifikant bewerten. Wie allgemein üblich wurde auch in dieser Arbeit ein p-Wert von $p \leq 0,05$ festgelegt. So wurden beide Fehler, die auftreten können, möglichst gering, bei 5% gehalten. Der Fehler 1. Art besagte, dass die Alternativhypothese fälschlicherweise als richtig angenommen wurde (falsch positiv). Beim Fehler 2. Art wurde die Alternativhypothese abgelehnt, obwohl sie zutraf (falsch negativ). Dies wurde auf Signifikanz mittels χ^2 -Tests (Chi-Quadrat-Test) durch Kontingenztabellen überprüft. Die Variablen, die für die Marburger DCM-Patienten erhoben wurden, wurden mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung hin überprüft. Lag diese vor, wurde die weitere Signifikanzberechnung mittels ANOVA- und Tukey-Test durchgeführt. Lag keine Normalverteilung vor, wurde die Signifikanz mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests ermittelt. Sämtliche Berechnungen wurden unter Verwendung der SPSS.19-Software für Windows auf einem handelsüblichen Personalcomputer ausgeführt.

3. Ergebnisse

Im Nachfolgenden werden die Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen des CTLA-4-CT60-(+6230)- und des -CT42-(+49)-Polymorphismus präsentiert. Dies erfolgt mit beispielhaften Abbildungen zunächst jeweils der Ergebnisse eines Gelelektrophoreselaufes und anschließend der Genotyp-Bestimmung im Falle des CTLA-4-CT60-Polymorphismus mittels Restriktionsverdau-Analyse bzw. beim CTLA-4-+49-Polymorphismus mittels DGGE. Es folgt die tabellarische und graphische Darstellung der Verteilungen der jeweiligen Genotypen und die daraus berechneten statistischen Ergebnisse.

3.1. Untersuchung des CT60-Polymorphismus

3.1.1. PCR-Produkte des CT60-Polymorphismus

Zum Nachweis des CTLA-4-CT60-Polymorphismus wurde ein 427bp langes DNA-Fragment zunächst mittels PCR amplifiziert und dann durch Agarose-Gelelektrophorese dargestellt. Die Abbildung 10 zeigt beispielhaft das Bandenmuster von PCR-Produkten. Zur Orientierung wurde ein DNA-Längenstandard aufgetragen.

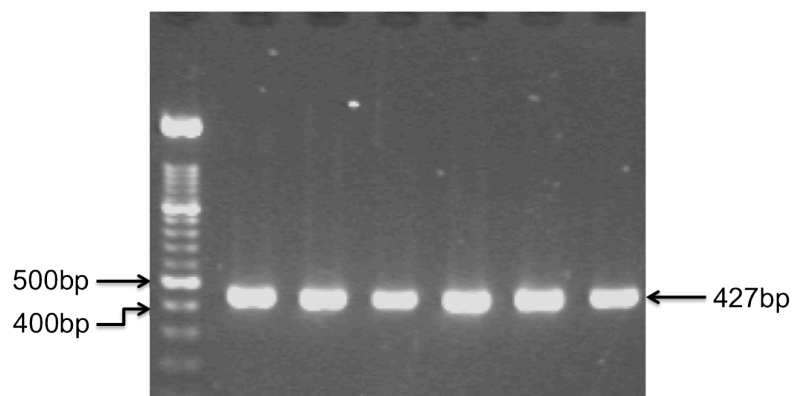


Abb. 10: Gelelektrophorese mit PCR-Produkten des CT60-Polymorphismus. In die linke Tasche wurde ein Längenstandard aufgetragen.

3.1.2. Restriktionsverdau-Analyse des CT60-Polymorphismus

Beim Enzymverdau spaltet die Restriktionsendonuklease NlaIII die 427bp lange DNA-Sequenz an ihrer Erkennungsfrequenz 5'-CATG-3' in unterschiedliche Spaltstücke, an denen man die verschiedenen Genotypen erkennen kann. Der Genotyp A/A lässt sich anhand von 5 Banden bei 157bp, 97bp, 82bp, 48bp und 43bp bestimmen (siehe Abbildung 11). Beim Genotyp G/G geht durch den Basenaustausch von Adenin zu Guanin eine Schnittstelle verloren, woraufhin nur 4 DNA-Fragmente mit 157bp, 140bp, 82bp und 48bp entstehen (siehe Abbildung 12). Bei Heterozygoten, die sowohl ein A- als auch ein G-Allel besitzen, kommt es zur Ausbildung von allen 6 Banden bei 157bp, 140bp, 97bp, 82bp, 48bp und 43bp.

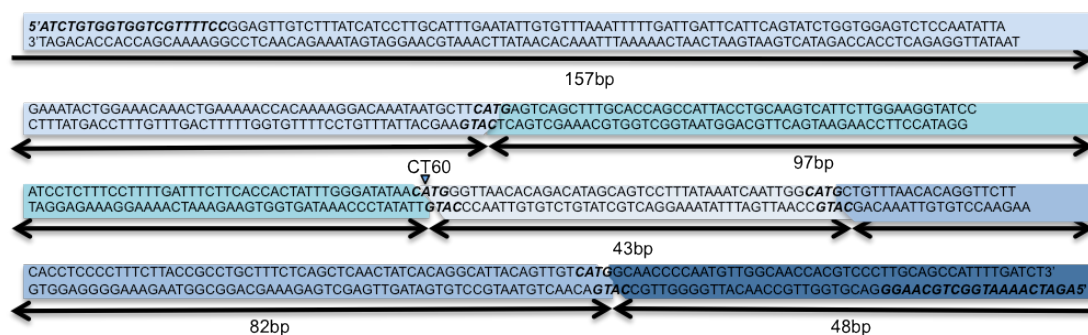


Abb. 11: Darstellung des CT60A-PCR-Produkts mit vier Schnittstellen

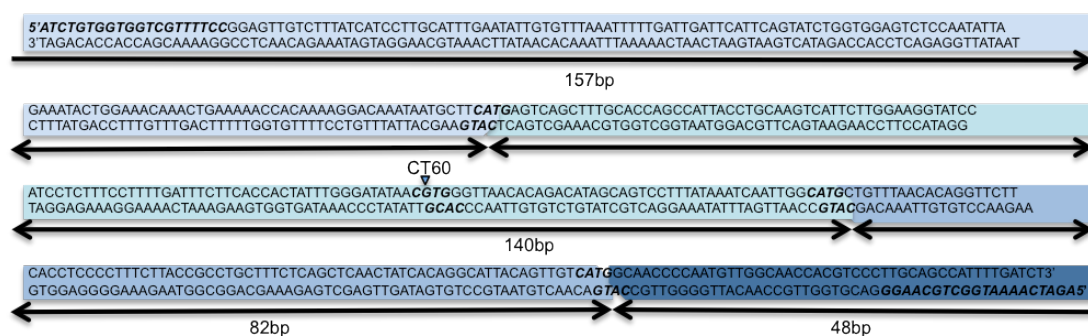


Abb. 12: Basensequenz des CT60G-PCR-Produkts mit drei Schnittstellen

Abbildung 13 stellt die durch den Restriktionsverdau entstehenden Banden der drei Genotypen des CTLA-4-CT60-Polymorphismus schematisch dar.

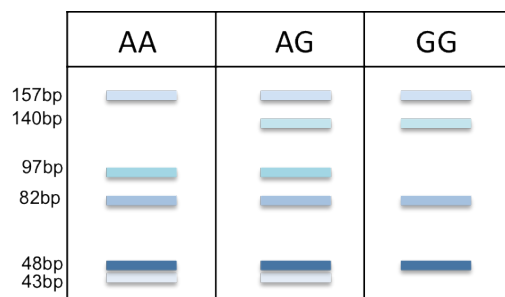


Abb. 13: Schematische Darstellung des Bandenmusters der mittels *NlaIII*-verdauten PCR-Ansätze für den CT60-RFLP je nach Genotyp AA, AG und GG

Abbildung 14 zeigt ein beispielhaftes Agarose-Gel, mit dem die Genotypisierung des CTLA-4-CT60-Polymorphismus in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde.

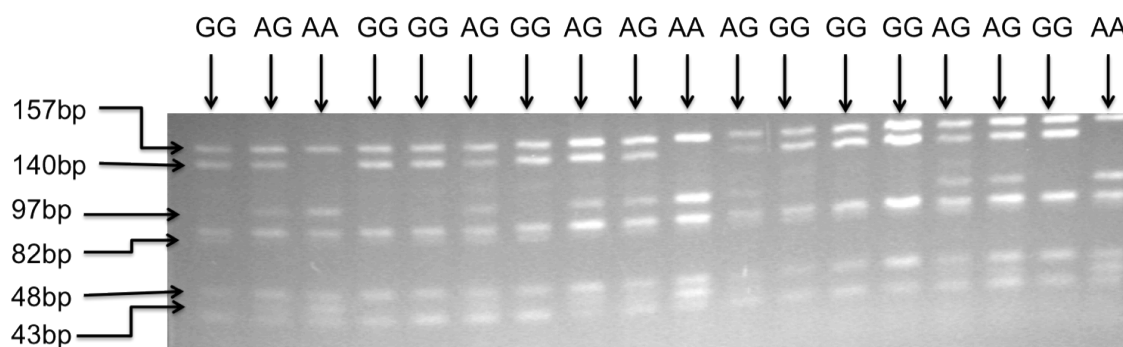


Abb. 14: Gelelektrophorese mit Produkten der Restriktionsverdau-Analyse des CTLA-4-CT60-Polymorphismus

3.1.3. Verteilung der Genotypen des CT60-Polymorphismus

Das Ergebnis der Genotypisierung des CTLA-4-CT60-SNP ist getrennt für die drei DCM-Kohorten Marburg 1, Marburg 2 und Berlin sowie für das Gesamtkollektiv in Tabelle 6 dargestellt. Anschließend sind die einzelnen Patientengruppen, jeweils im Vergleich zu der Kontrollgruppe, in graphischer Form abgebildet. Unter dem entsprechenden Balkendiagramm finden sich die Ergebnisse der Signifikanztestung. Im Anschluss finden sich die gleichen Untersuchungen für die Allelverteilung.

Tabelle 6: Verteilung der Genotypen des CTLA-4-CT60-Polymorphismus

	DCM Marburg 1	DCM Marburg 2	DCM Berlin	DCM gesamt	Kontrollen
Gesamt (n)	148	102	207	457	534
CT60A/CT60A	25 (17%)	22 (22%)	50 (24%)	97 (21%)	137 (26%)
CT60A/CT60G	67 (45%)	47 (46%)	89 (43%)	203 (45%)	236 (44%)
CT60G/CT60G	56 (38%)	33 (32%)	68 (33%)	157 (34%)	161 (30%)

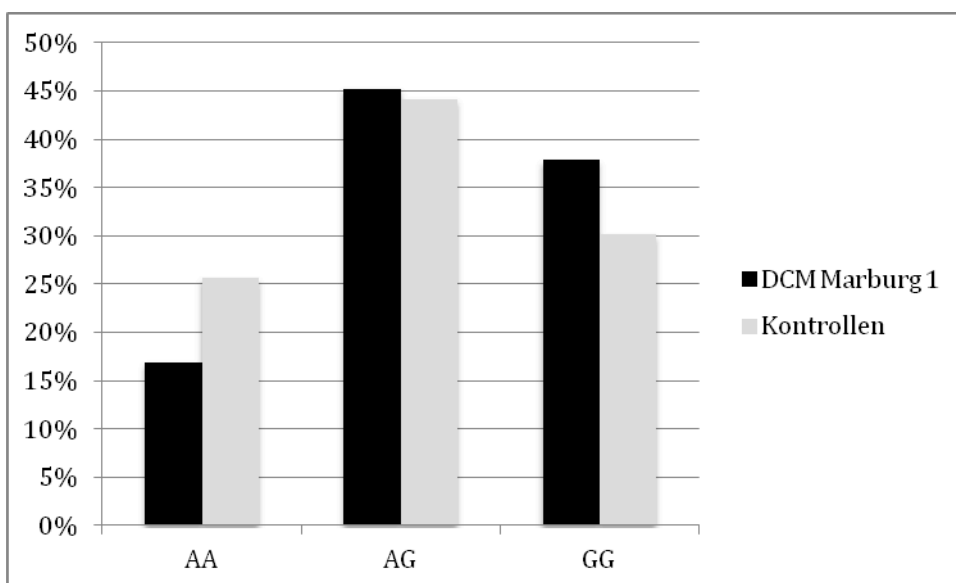


Abb. 15: Verteilung der Genotypen des CT60-Polymorphismus im DCM-Kollektiv Marburg 1 und in der Kontrollkohorte

Der mittels Chi-Quadrat-Test berechnete p-Wert ergab 0,052 (Chi-Quadrat-Wert =0,975, df=2) und lag damit leicht über dem festgelegten Signifikanzniveau von $p < 0,05$. Auch wenn der Genotyp GG bei den DCM-Patienten prozentual häufiger vorkommt als bei den Kontrollen, wie man Abbildung 15 entnehmen kann, ist dieser Unterschied folglich nicht signifikant.

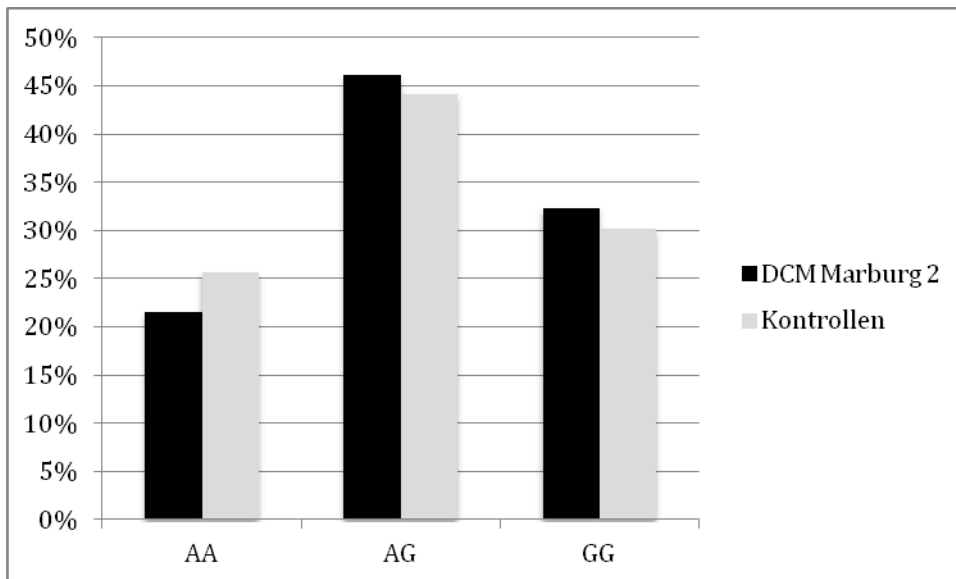


Abb. 16: Genotypen des CT60-Polymorphismus in der DCM-Kohorte Marburg 2 und im Kontrollkollektiv

Die Verteilung der Genotypen AA, AG und GG des CTLA-4-CT60-Polymorphismus zwischen der Gruppe DCM-Marburg 2 und den Kontrollen unterschied sich nicht signifikant (Abbildung 16). Dieses ergab der mittels Chi-Quadrat-Test berechnete p-Wert von 0,678 (Chi-Quadrat-Wert=0,712, df=2).

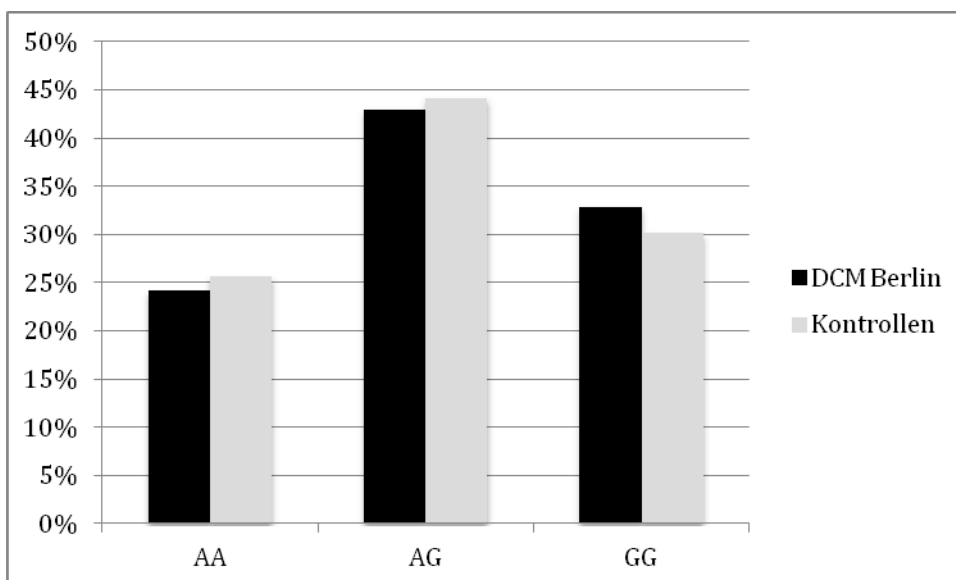


Abb. 17: Genotypfrequenzen des CT60-Polymorphismus in Berliner DCM-Patienten und gesunden Kontrollpersonen

Wie aus Abbildung 17 ersichtlich, fand sich auch in der Berliner DCM-Kohorte kein Unterschied in der Genotypfrequenz des CT60-Polymorphismus ($p=0,766$, Chi-Quadrat-Wert=0,682, df=2). Daraus folgt, dass sich die Genotypen AA, AG und GG des

CTLA-4-CT60-Polymorphismus in ihrer Verteilung zwischen den DCM-Patienten aus Berlin und den Kontrollen nicht signifikant unterscheiden.

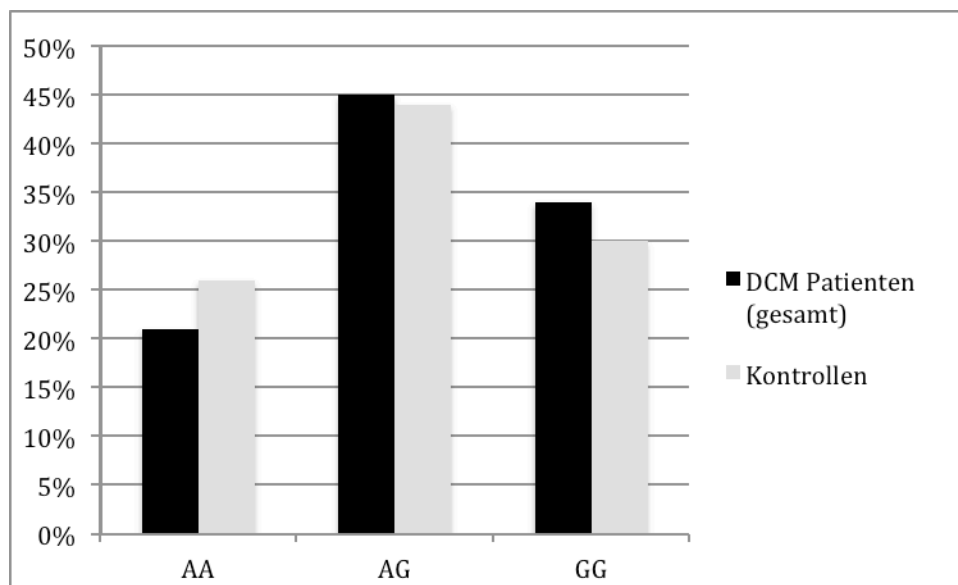


Abb. 18: Zusammenfassung der Genotypfrequenzen des CT60-Polymorphismus in der vereinigten Population der DCM-Patienten verglichen mit gesunden Blutspendern

Da sich die Genotypverteilungen jeweils zwischen den einzelnen DCM-Patienten-Gruppen und den Kontrollen nicht signifikant unterscheiden, wurden alle DCM-Patienten noch als gemeinsames Kollektiv mit der Kontrollgruppe verglichen. Auch hier erreichte das Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests nicht das Signifikanzniveau ($p=0,82$, Chi-Quadrat-Wert=3,406, $df=2$). Die Genotypen AA, AG und GG des CTLA-4-CT60-Polymorphismus unterscheiden sich also auch zwischen dem Gesamtkollektiv der DCM-Patienten und den Kontrollen nicht signifikant.

Abbildung 19 stellt die Genotypverteilung aller DCM-Gruppen und der Kontrollgruppe zum Vergleich gegenüber.

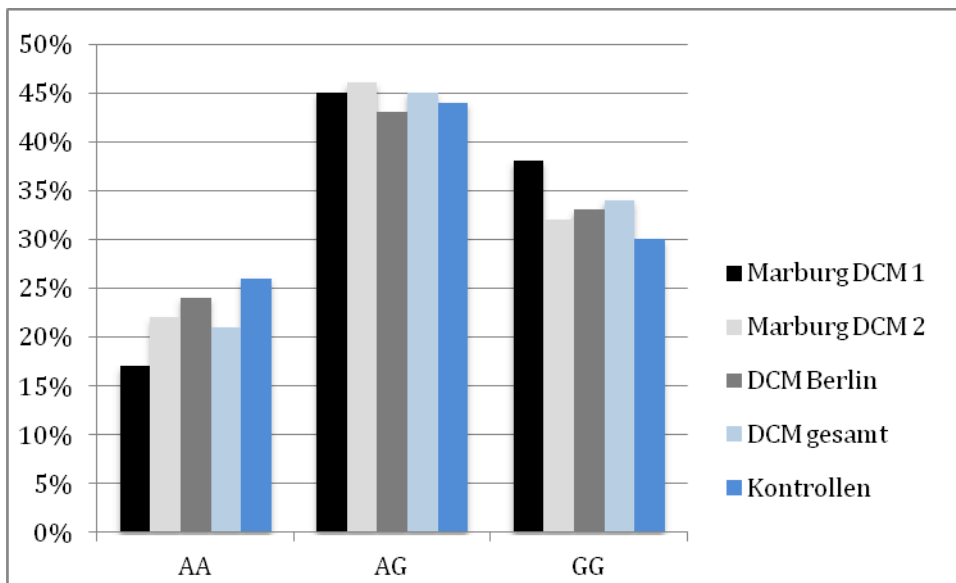


Abb. 19: Gegenüberstellung der Genotypverteilungen des CTLA-4-CT60-Polymorphismus der verschiedenen DCM-Gruppen und der Kontrollgruppe

Tabelle 7 listet die Allelverteilungen des CTLA-4-CT60-Polymorphismus der verschiedenen Studiengruppen auf. Anschließend erfolgt die graphische Darstellung der einzelnen DCM-Kohorten jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Tabelle 7: Allelfrequenzen des CTLA-4-CT60-Polymorphismus

	DCM Marburg 1	DCM Marburg 2	DCM Berlin	DCM gesamt	Kontrollen
Gesamt (n)	296	204	414	914	1068
CT60A	117 (40%)	91 (45%)	189 (46%)	397 (43%)	510 (48%)
CT60G	179 (60%)	113 (55%)	225 (54%)	517 (57%)	558 (52%)

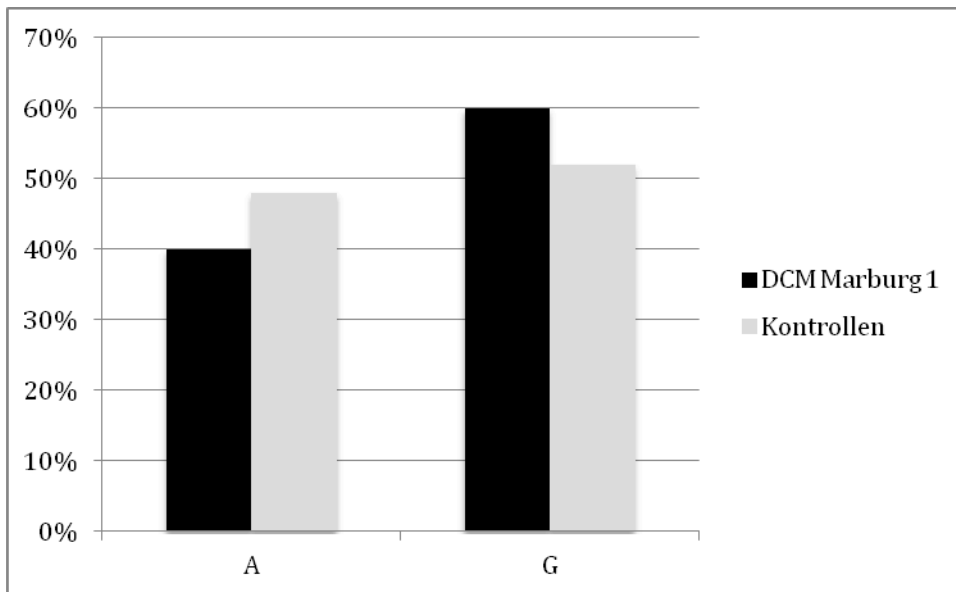


Abb. 20: Verteilung der Allele des CT60-Polymorphismus in der DCM-Kohorte Marburg 1 und im Kontrollkollektiv

Der mittels des Chi-Quadrat-Tests berechnete p-Wert ergab 0,012 (Chi-Quadrat-Wert=6,311, df=1). Damit ist das CTLA-4-CT60-G-Allel in der DCM-Gruppe Marburg 1 bezüglich der Allelverteilung signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe (Abb. 20).

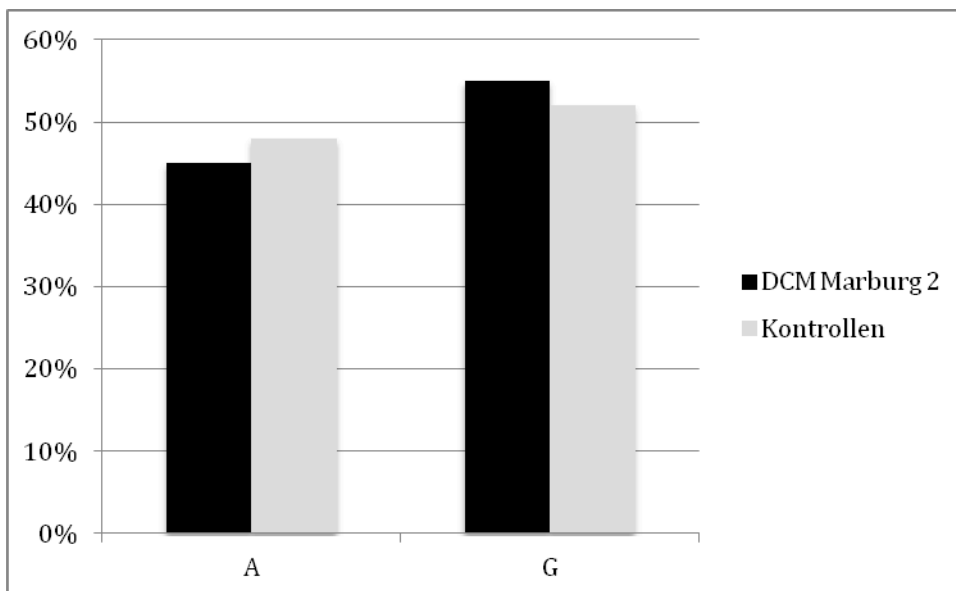


Abb. 21: Allelverteilung des CT60-SNP in der DCM-Kohorte Marburg 2 und in Kontrollen

Wie in Abbildung 21 ersichtlich zeigten die DCM-Patienten der Gruppe Marburg 2 zwar einen höheren Prozentsatz am G-Allel als die gesunden Probanden, dieser Unterschied erlangte jedoch keine Signifikanz ($p=0,41$, Chi-Quadrat-Wert=0,679, df=1).

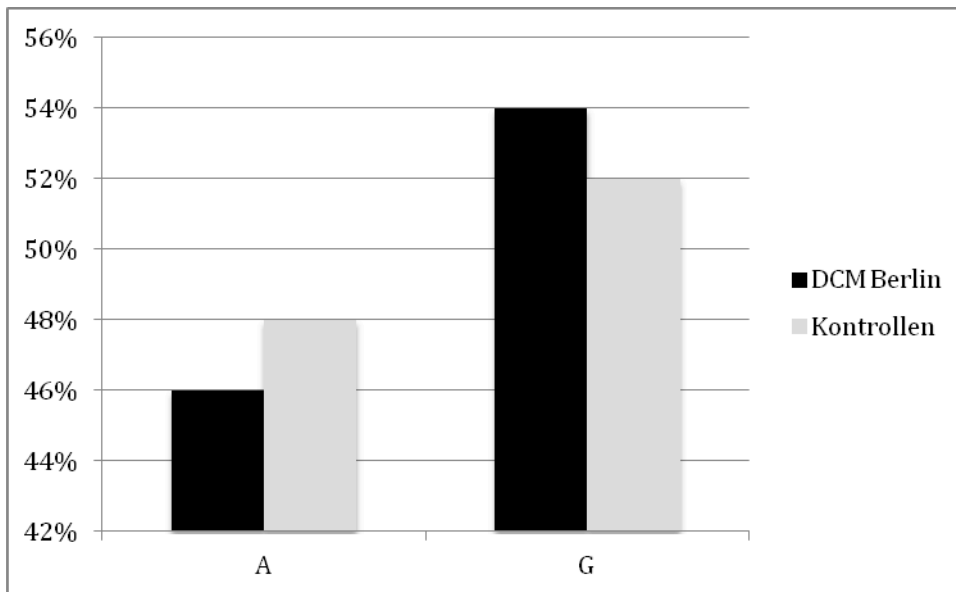


Abb. 22: Darstellung der Allelfrequenz des CT60-Polymorphismus in den Kohorten von Berliner DCM-Patienten und gesunden Kontrollpersonen

Obwohl DCM-Patienten aus der Berliner Kohorte häufiger das G-Allel besaßen als die Kontrollen, erreichte dieser Unterschied mit einem p-Wert von 0,467 nicht die Signifikanzgrenze (Chi-Quadrat-Wert=0,529, df=1). So lag die Häufigkeit des G-Allels in der DCM-Gruppe bei 54% und die des A-Allels bei 46%. Im Kontrollkollektiv kam das G-Allel zu 52% vor und das A-Allel zu 48% (Abb. 22).

Da sich die Allelverteilungen zwar zwischen DCM-Marburg 1 und den Kontrollen signifikant unterscheiden, aber nicht zwischen den anderen DCM-Gruppen und der jeweiligen Kontrollgruppe, wurden alle DCM-Patienten noch als gemeinsames Kollektiv mit der Kontrollgruppe verglichen.

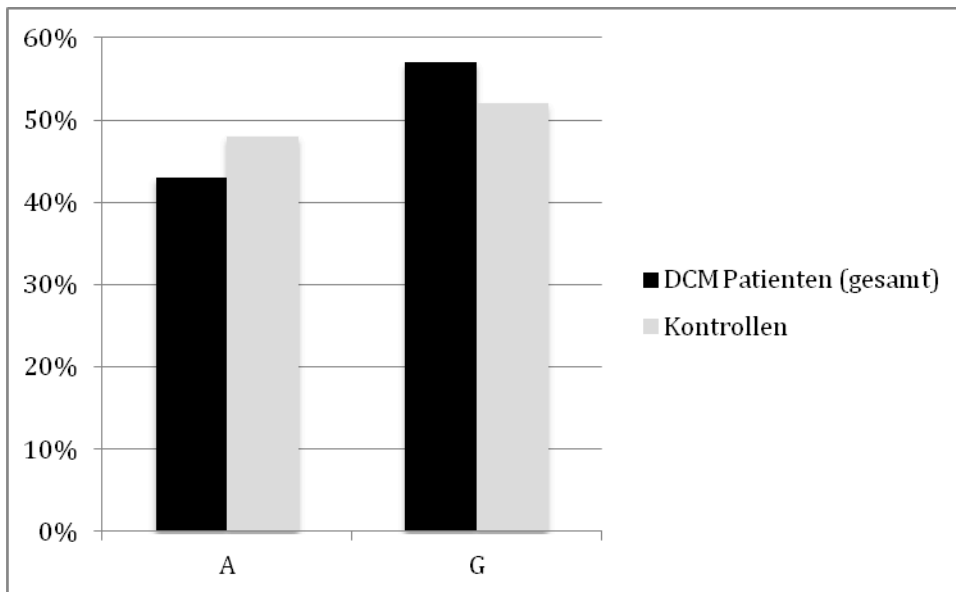


Abb. 23: Allelhäufigkeit des CT60-Polymorphismus bei DCM-Patienten (gesamt) und Kontrollen

Wie man in Abbildung 23 sieht, kommt das Allel G bei allen DCM-Patienten mit 57% prozentual häufiger vor, als bei den Kontrollen mit 52% und das A-Allel tritt im Gegensatz dazu bei DCM-Patienten mit 43% seltener auf als bei den Kontrollen mit 48%. Der mittels des Chi-Quadrat-Tests berechnete p-Wert ergab jedoch 0,054 (Chi-Quadrat-Wert=3,713, df=1) und erreichte damit das festgelegte Signifikanzniveau von $p < 0,05$ knapp nicht. Abbildung 24 stellt die Allelfrequenzen aller DCM-Gruppen und der Kontrollgruppe zum Vergleich gegenüber.

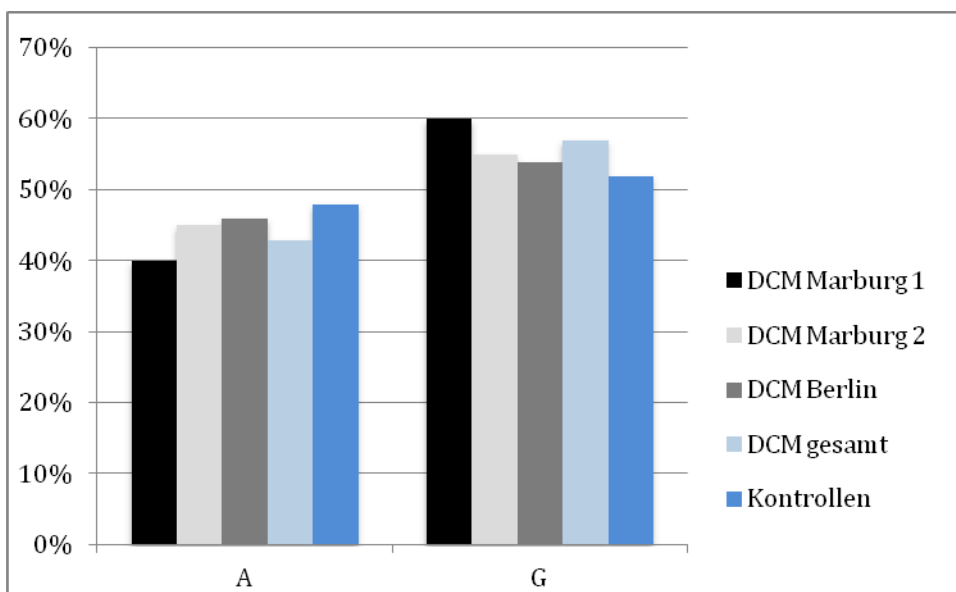


Abb. 24: Gegenüberstellung der Allelverteilung des CT60-Polymorphismus in den verschiedenen DCM-Gruppen und der Kontrollgruppe

3.1.4. Analyse des CT60-Polymorphismus im Marburger Patientenkollektiv

3.1.4.1. Gemessene Parameter in der Marburger Patientenkohorte

Für die nähere Untersuchung des CT60-Polymorphismus bei DCM-Patienten wurden die beiden Marburger Patientengruppen zu einem Kollektiv zusammengefasst. Dieses beinhaltete 250 Patienten, darunter 182 Männer (72,8%). Das mittlere Alter betrug bei Beginn der Studie $50,3 \pm 12,7$ Jahre. 42 Patienten litten an begleitenden Immun-erkrankungen im weitesten Sinne, wobei einige Patienten von mehreren immuno-logisch vermittelten Erkrankungen betroffen waren: 10 Patienten litten an Nahrungs-mittelallergie, 9 Patienten an Psoriasis, 1 Patient an Spondylitis ankylosans, 1 Patient an rheumatoider Arthritis, 2 Patienten an chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, 8 Patienten an Asthma, 1 Patient an Tierhaarallergie, 18 Patienten an allergischer Rhinitis, 1 Patient an Diabetes mellitus Typ 1, 3 Patienten an Neurodermitis, 1 Patient an Morbus Basedow und 1 Patient an Hashimoto-Thyreoiditis. Der mittlere LVEDD bei Studienbeginn betrug $39,46 \pm 12,6$ mm und die mittlere EF 29,6% mit einer Standard-abweichung von 8,5%. Bei 247 DCM-Patienten der Studiengruppe wurde 12 Monate nach der Diagnose erneut eine klinische Untersuchung und eine echokardiographische Messung der EF bzw. bei n=199 Patienten auch des LVEDD durchgeführt. Andere erhobene Parameter waren Größe, Gewicht, Herzfrequenz, Angina-pectoris-Beschwer-den, Einordnung des Herzinsuffizienzgrades nach der NYHA-Klassifikation, der Parvo-virus-B19-Status und Hinweise auf eine familiäre oder eine nicht-familiäre DCM. Außerdem wurde während der Herzkatheteruntersuchung die Ejektionsfraktion invasiv gemessen. Die Analyse der gemessenen Parameter unterschied sich zwischen den intervallskalierten Variablen auf der einen und den ordinal- bzw. nominalskalierten Variablen auf der anderen Seite. Die in Tabelle 8 angegebenen intervallskalierten Variablen wurden mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung hin untersucht und anschließend durch ANOVA/Tukey/Kruskal-Wallis-Tests auf Signifi-kanzen getestet. Die graphische Darstellung erfolgte unter Verwendung von Box-Plot-Diagrammen (Abbildung 25). Die Ordinal- und nominalskalierte Variablen dagegen wurden mittels Chi-Quadrat-Tests und Säulendiagrammen analysiert bzw. dargestellt.

3.1.4.2. Analyse der intervallskalierten Variablen des CT60-SNP

Tabelle 8: Klinische und kardiale Parameter des Marburger DCM-Kollektivs in Bezug auf die Genotypen des CT60-SNP (Abkürzungen: MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung, N=Anzahl)

	AA			AG			GG			Gesamt		
	MW	N	SD	MW	N	SD	MW	N	SD	MW	N	SD
Alter	51,0	47	13,9	51,4	114	12,0	48,7	89	12,9	50,3	250	12,7
Größe	175,2	47	9,4	181,9	106	59,2	175,6	81	9,4	178,4	234	40,5
Gewicht	85,5	47	19,0	86,3	106	17,1	85,6	81	17,6	85,9	234	17,6
HF	73,0	40	13,4	75,0	100	16,1	81,4	80	16,5	77,0	220	16,1
EF invasiv	29,3	44	11,9	34,5	105	13,0	34,7	81	12,8	33,6	230	12,8
EF Echo Einschluss	29,7	47	8,1	30,6	112	8,3	28,2	88	8,8	29,6	247	8,5
EF Echo Follow-Up	38,2	38	10,8	39,4	100	13,6	40,1	73	12,1	39,5	211	12,6
LVEDD Einschluss	68,8	47	8,4	67,0	112	8,9	68,2	88	7,9	67,8	247	8,4
LVEDD Follow-Up	65,8	34	9,6	64,3	95	9,3	63,9	70	9,4	64,4	199	9,3

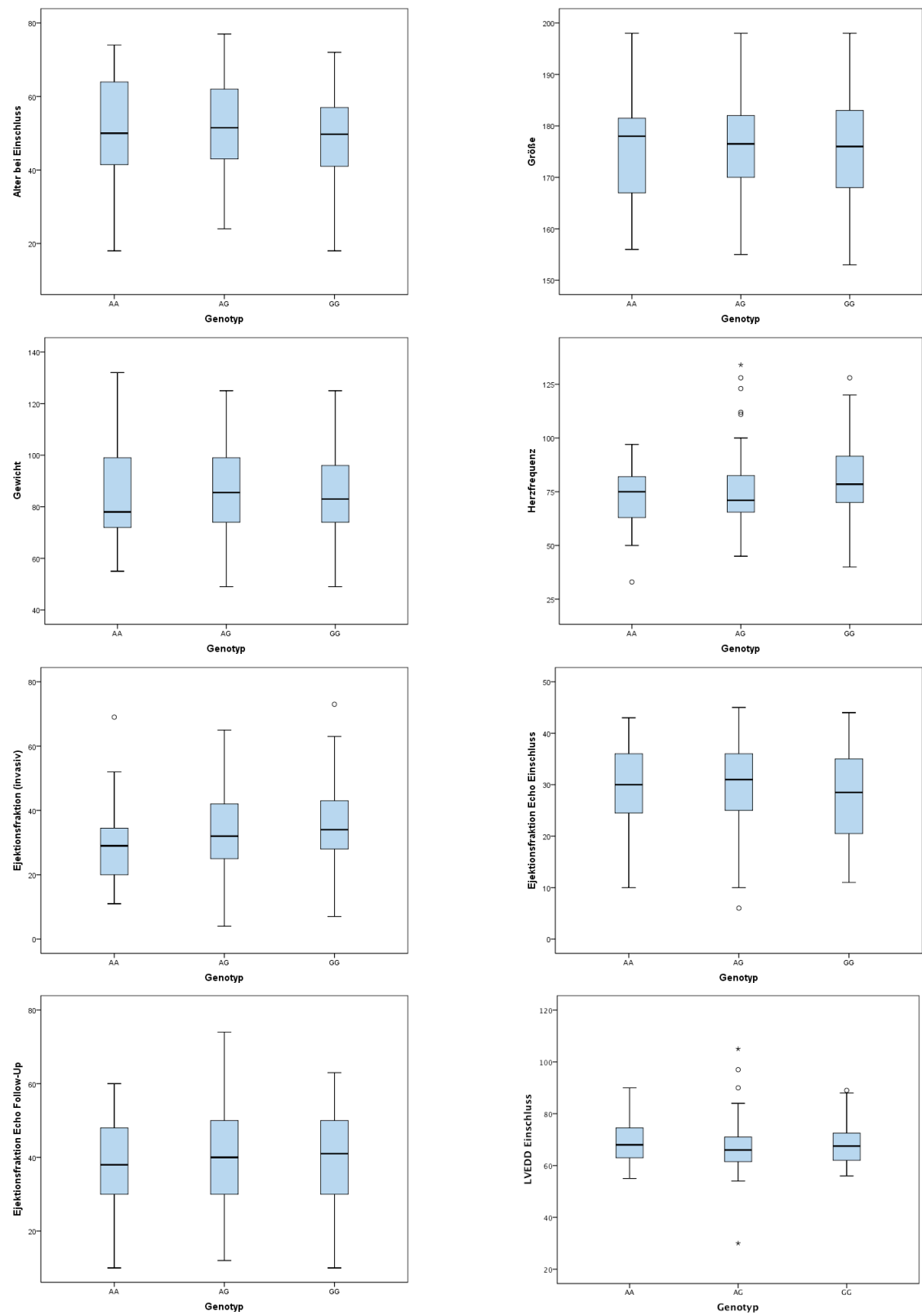
Mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests wurden die gemessenen intervallskalierten Variablen auf ihre Übereinstimmung mit einer Normalverteilung hin getestet (Tabelle 9).

Tabelle 9: Ergebnisse des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests für den CT60-SNP. (Abkürzungen: MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung, K.-S.-Zahl= Kolmogorov-Smirnov-Zahl, AS=Asymptotische Signifikanz, N=Anzahl)

	N	Parameter Normal-verteilung		Extremste Differenzen			K.-S. Zahl	AS (2-seitig)
		MW	SD	Absolut	Positiv	Negativ		
Alter	250	50,3	12,7	0,10	0,03	-0,06	0,93	0,36
Größe	234	175,8	8,9	0,07	0,04	-0,07	1,14	0,15
Gewicht	234	85,9	17,6	0,09	0,09	-0,05	1,42	0,04
HF	220	77,0	16,1	0,10	0,10	-0,06	1,52	0,02
EF invasiv	230	33,6	12,8	0,07	0,07	-0,04	1,12	0,16
EF Echo Einschluss	247	29,6	8,5	0,10	0,05	-0,10	1,52	0,02
EF Echo Follow-Up	211	39,5	12,6	0,06	0,05	-0,06	0,80	0,54
LVEDD Einschluss	247	67,8	8,4	0,10	0,10	-0,07	1,50	0,02
LVEDD Follow-Up	199	64,4	9,3	0,09	0,09	-0,04	1,31	0,07

Die Parameter Alter, Größe, ventrikulographisch bzw. echokardiographisch gemessene Ejektionsfraktion (EF invasiv bzw. EF Echo), linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser (LVEDD) bei Studieneinschluss (Einschluss) bzw. Nachuntersuchung (Follow-Up) waren normalverteilt. Für die weiteren Variablen Gewicht, Herzfrequenz (HF), EF Echo Einschluss und LVEDD Einschluss dagegen lag keine Normalverteilung vor.

Um festzustellen, ob Zusammenhänge zwischen bestimmten Variablen und Genotypen bestehen, wurden die intervallskalierte Variablen in Form von Box-Plot-Diagrammen dargestellt (Abbildung 25). Um zu bewerten, ob die Zusammenhänge das Signifikanzniveau erreichen, wurde mit den normalverteilten Variablen ein ANOVA- und ein Tukey-Test durchgeführt. Die nicht normalverteilten Variablen dagegen wurden mittels eines Kruskal-Wallis Tests analysiert.



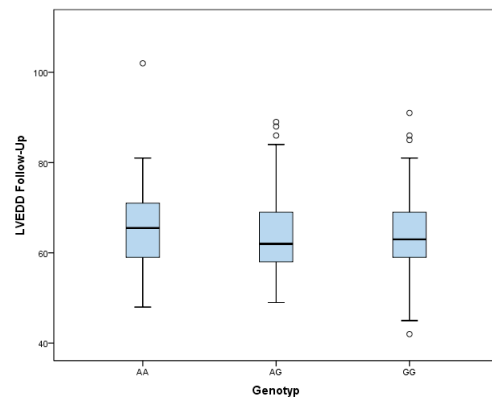


Abb. 25: Box-Plot-Diagramme klinischer und hämodynamischer Parameter in Abhängigkeit des CT60-SNP-Genotyps

Im Folgenden sind die Signifikanzberechnungen zunächst der normalverteilten Variablen mittels ANOVA- (Tabelle 10) und Tukey-Test (Tabelle 11) und anschließend der nicht-normalverteilten Variablen mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests (Tabelle 12) abgebildet.

Tabelle 10: ANOVA-Test der normalverteilten Variablen des CT60-SNP (Abkürzungen: df=Freiheitsgrad, F=Teststatistik aus der Varianzanalyse)

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Alter	Zwischen den Gruppen	389	2	194	1,2	0,3
	Innerhalb der Gruppen	39732	247	161		
	Gesamt	40120	249			
Größe	Zwischen den Gruppen	49	2	25	0,3	0,7
	Innerhalb der Gruppen	18448	231	80		
	Gesamt	18497	233			
EF invasiv	Zwischen den Gruppen	100	2	502	3,1	0,047
	Innerhalb der Gruppen	36775	227	162		
	Gesamt	37779	229			
EF Echo Follow-Up	Zwischen den Gruppen	93	2	46	0,3	0,8
	Innerhalb der Gruppen	33090	208	159		
	Gesamt	33183	210			
LVEDD Follow-Up	Zwischen den Gruppen	88	2	44	0,5	0,6
	Innerhalb der Gruppen	17164	196	88		
	Gesamt	17252	198			

Der ANOVA-Test ermittelte einen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen in Bezug auf den Parameter der invasiv bestimmten Ejektionsfraktion ($p=0,047$). Alle anderen Variablen besaßen einen p -Wert $>0,05$ und sind folglich als nicht signifikant zu werten.

Der nachfolgende Tukey-Test zeigte an, zwischen welchen Genotypen eventuelle signifikante Unterschiede lagen.

Tabelle 11: Tukey-Test der normalverteilten Variablen des CTLA-4-CT60-SNP

Abhängige Variable	Genotypen	Genotypen	Signifikanz
Alter	AA	AG	0,988
		GG	0,556
	AG	AA	0,988
		GG	0,294
	GG	AA	0,556
		AG	0,294
Größe	AA	AG	0,751
		GG	0,968
	AG	AA	0,751
		GG	0,845
	GG	AA	0,968
		AG	0,845
EF invasiv	AA	AG	0,062
		GG	0,060
	AG	AA	0,062
		GG	0,990
	GG	AA	0,060
		AG	0,990
EF Echo Follow-Up	AA	AG	0,867
		GG	0,726
	AG	AA	0,867
		GG	0,931
	GG	AA	0,726
		AG	0,931
LVEDD Follow-Up	AA	AG	0,682
		GG	0,588
	AG	AA	0,682
		GG	0,967
	GG	AA	0,588
		AG	0,967

Der Tukey-Test bekräftigte die Ergebnisse des ANOVA-Tests und zeigte, dass keine signifikanten Unterschiede innerhalb der drei Genotypengruppen bezüglich der verschiedenen Variablen bestehen. Das Ergebnis des ANOVA-Tests des Parameters der invasiv gemessenen Ejektionsfraktion mit einem p-Wert von 0,047 konnte im Tukey-Test allerdings nicht bestätigt werden.

Die nichtnormalverteilten Parameter wurden einem nicht-parametrischen H-Test nach Kruskal-Wallis unterzogen.

Tabelle 12: Kruskal-Wallis-Test der nicht normalverteilten Variablen des CTLA-4-CT60-SNP (Abkürzungen: df=Freiheitsgrad, N=Anzahl)

	Genotypen	N	Mittelwert
Gewicht	AA	47	113,3
	AG	106	120,5
	GG	81	116,0
	Gesamt	234	
HF	AA	40	102,5
	AG	100	100,0
	GG	80	127,7
	Gesamt	220	
EF Echo Einschluss	AA	47	124,4
	AG	112	133,0
	GG	88	112,3
	Gesamt	247	
LVEDD Einschluss	AA	47	133,1
	AG	112	117,0
	GG	88	128,1
	Gesamt	247	

	Gewicht	HF	EF Echo Einschluss	LVEDD Einschluss
Chi-Quadrat	0,43	9,23	4,16	2,14
df	2	2	2	2
Asymptotische Signifikanz	0,806	0,010	0,125	0,343

Der Kruskal-Wallis-Test ergab, dass lediglich zwischen dem Parameter Herzfrequenz und den verschiedenen Genotypen ein signifikanter Zusammenhang bestand. Aus den Mittelwerten der drei Genotypen ließ sich ablesen, dass die DCM-Patienten mit dem CTLA-4-CT60-GG-Genotyp durchschnittlich die höchste Herzfrequenz besaßen.

3.1.4.3. Analyse der nominal- und ordinalskalierten Variablen des CT60-SNP

Zunächst erfolgt in Tabelle 13 die Angabe der Genotypverteilung des CT60-Polymorphismus in Bezug auf die erhobenen klinischen Variablen der NYHA-Klassifizierung, des Vorhandenseins einer Angina-pectoris-Symptomatik oder Hinweisen auf eine familiäre bzw. nicht-familiäre Genese sowie der Detektion von Parvovirus-DNA in Endomyokardproben.

Tabelle 13: Kardiologische Variablen des Marburger DCM-Kollektivs in Bezug auf die Genotypen des CT60-SNP

		AA	AG	GG	Gesamt
NYHA	1	2 (10%)	10 (48%)	9 (43%)	21
	2	11 (17%)	31 (48%)	22 (34)	64
	3	26 (22%)	52 (43%)	42 (35%)	120
	4	4 (31%)	4 (31%)	5 (38%)	13
	fehlend	4	17	11	32
Angina pectoris	atypische AP	6 (14%)	16 (36%)	22 (50%)	44
	CCS1	2 (13%)	8 (53%)	5 (33%)	15
	CCS2	1 (17%)	1 (17%)	4 (67%)	6
	CCS3	1 (25%)	2 (50%)	1 (25%)	4
	keine AP	29 (23%)	57 (45%)	42 (22%)	128
	fehlend	8	30	15	53
familiäre/nicht-familiäre DCM	familiär	9 (17%)	20 (38%)	23 (44%)	52
	nicht-familiär	38 (19%)	93 (47%)	66 (34%)	197
	fehlend	1	0	0	1
Parvovirus B19	positiv	17 (27%)	24 (38%)	22 (35%)	63
	negativ	30 (17%)	84 (48%)	61 (35%)	175
	fehlend	0	6	6	12

Da die Signifikanztestung der Genotypverteilung des CT60-SNP mittels ANOVA- und Tukey-Test nur in Bezug zu intervallskalierten Variablen möglich ist, erfolgte sie für die ordinal- und nominalskalierten Variablen durch Chi-Quadrat-Tests. Die Ergebnisse der Chi-Quadrat-Tests sind unter den entsprechenden Säulendiagrammen aufgeführt.

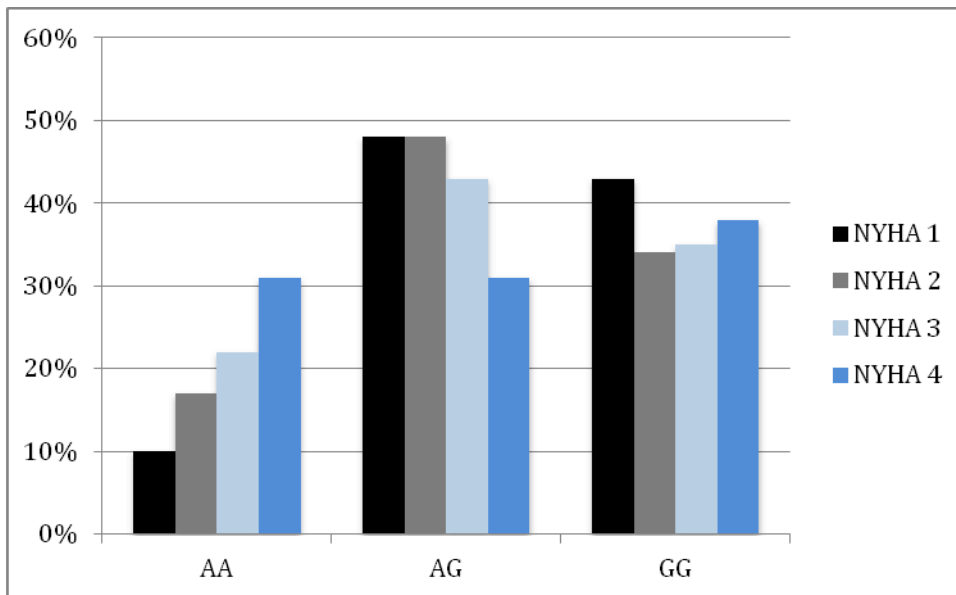


Abb. 26: NYHA-Stadien in Abhängigkeit vom Genotyp des CTLA-4-CT60-Polymorphismus innerhalb des Marburger DCM-Kollektivs in Prozentangaben

Mithilfe des Chi-Quadrat-Tests wurde berechnet, ob sich die NYHA-Stadien zwischen den verschiedenen Genotypen des CT60-Polymorphismus unterscheiden (Abbildung 26). Dies war mit einem p-Wert von 0,766 (Chi-Quadrat-Wert=4,925, df=8) nicht der Fall.

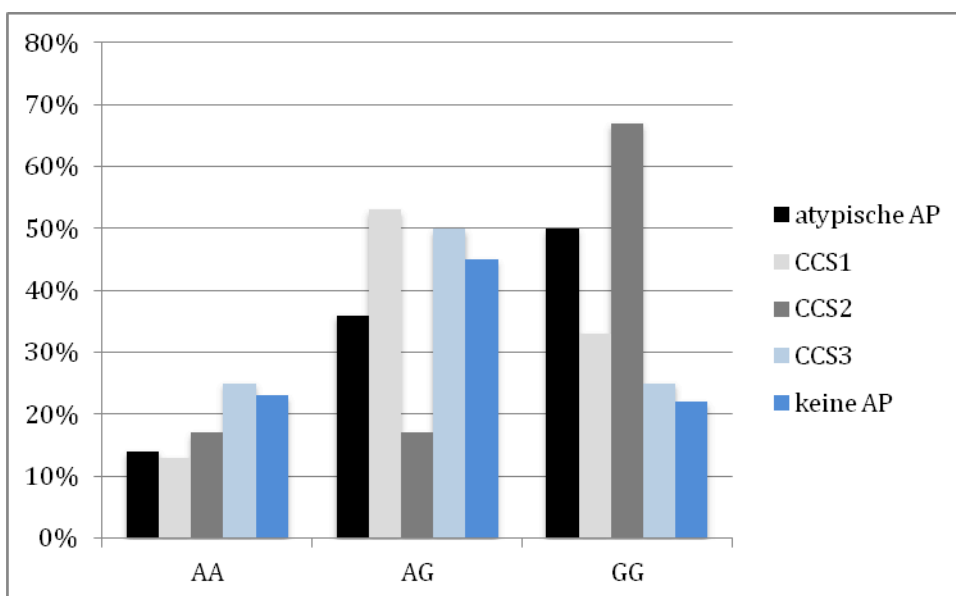


Abb. 27: Angina-pectoris-(AP)-Beschwerden in Abhängigkeit vom Genotyp des CTLA-4-CT60-Polymorphismus innerhalb des Marburger DCM-Kollektivs in Prozent. CCS= Canadian cardiovascular Society, CCS1 geringe AP bei schwerer Belastung bis CCS3 schwere AP bei geringer Belastung, bei der atypischen AP liegt keine Belastungsabhängigkeit vor.

Die Häufigkeit von Angina-pectoris-Beschwerden in Abhängigkeit vom Genotyp des CT60-SNP bei Marburger DCM-Patienten ist in Abbildung 27 dargestellt. Um einen eventuellen Zusammenhang zwischen Angina-pectoris-Beschwerden der Marburger DCM-Patienten und dem CTLA-4-CT60-Genotyp aufzudecken, wurde ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Dieser ergab allerdings keine Signifikanz ($p=0,331$, Chi-Quadrat-Wert=11,346, $df=10$).

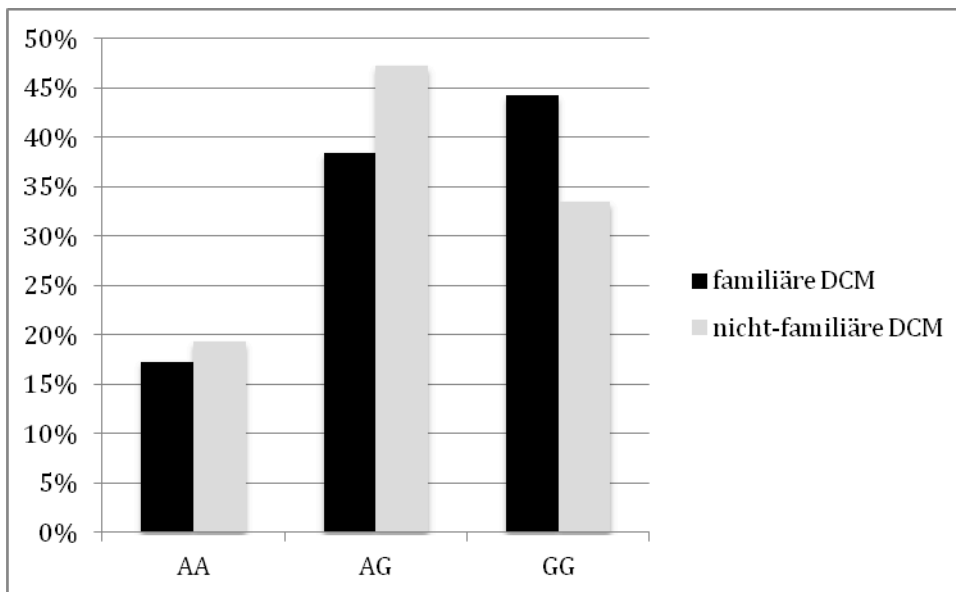


Abb. 28: Abhängigkeit der DCM-Genese (familiär/nicht-familiär) vom Genotyp des CTLA-4-CT60-Polymorphismus innerhalb des Marburger DCM-Kollektivs in Prozentangaben

Die statistische Überprüfung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen AA, AG und GG des CTLA-4-CT60-SNP bei Patienten mit familiärer DCM im Vergleich zu Patienten mit nicht-familiärer DCM ($p=0,349$, Chi-Quadrat-Wert=2,104, $df=2$). Die entsprechende graphische Darstellung ist der Abbildung 28 zu entnehmen.

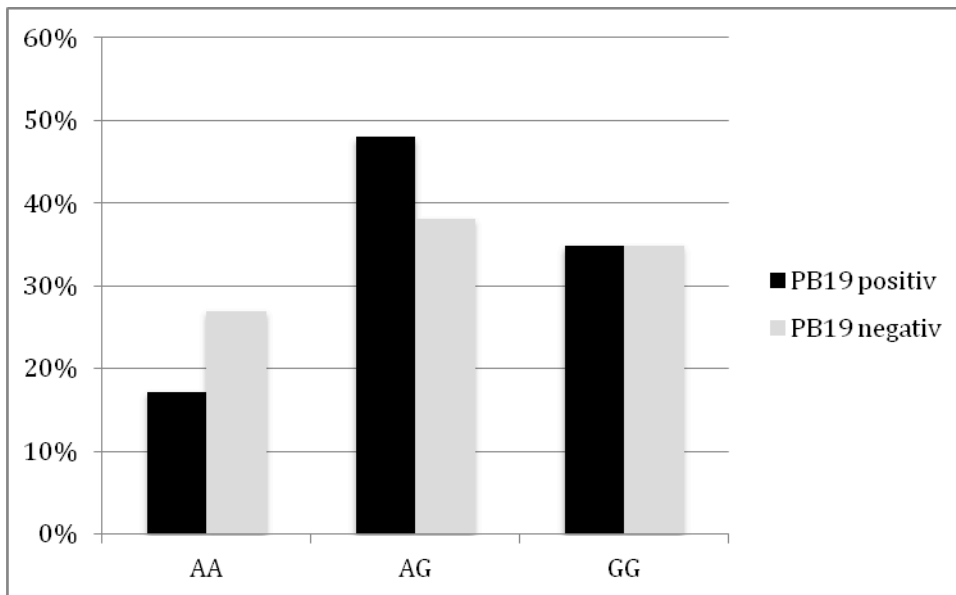


Abb. 29: Parvovirus-B19-(PB19)-Nachweis in Abhängigkeit vom Genotyp des CTLA-4-CT60-Polymorphismus innerhalb des Marburger DCM-Kollektivs

Ähnliche Resultate lieferte auch die Untersuchung der myokardialen Parvovirus-B19-Detektion in Bezug auf die Genotyp-Verteilung (Abbildung 29), die ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Nachweis viraler DNA in Endomyokardbiopsien und dem Vorliegen der CTLA-4-CT60-Genotypen AA, AG und GG im Marburger DCM-Patienten-Kollektiv erbrachte ($p=0,162$, Chi-Quadrat-Wert=6,541, $df=4$).

3.1.5. Verteilung der CT60-Genotypen in Abhängigkeit des Vorhandenseins einer Autoimmunerkrankung

Zuletzt wurde untersucht, ob der Genotyp des CTLA-4-CT60-Polymorphismus im Zusammenhang mit dem Vorkommen einer zusätzlichen Autoimmunerkrankung oder immunologisch vermittelten Erkrankung bei den DCM-Patienten steht. Da eine Häufung des CT60-G/G-Genotyps bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen in diversen Studien beschrieben wurde (siehe Diskussion), könnte ein möglicher Bias entstehen, indem eine entdeckte Häufung des CT60-G/G-Genotyps bei DCM-Patienten nicht ursächlich mit der DCM zusammenhängt, sondern aufgrund von komorbiden Immunerkrankungen besteht. Um diesen Bias auszuschließen, wurden DCM-Patienten mit und ohne komorbide Immunerkrankungen verglichen. Dabei wurde der Begriff der komorbiden Immunerkrankung bewusst weit gefasst. Zunächst stellt Tabelle 14 die Häufigkeiten und Prozentangaben der Genotypverteilungen in Bezug zu einer zusätzlichen Immunerkrankung dar.

Tabelle 14: Genotypverteilung des CT60-Polymorphismus in Abhängigkeit zum Vorliegen einer Immunerkrankung bei DCM-Patienten

	DCM-Patienten mit Immunerkrankung	DCM-Patienten ohne Immunerkrankung	Kontrollen
Gesamt (n)	42	208	534
CT60A/CT60A	9 (21%)	38 (18%)	137 (26%)
CT60A/CT60G	19 (45%)	95 (46%)	236 (44%)
CT60G/CT60G	14 (33%)	75 (36%)	161 (30%)

Im Folgenden ist eine mögliche Assoziation zwischen einer zusätzlichen Immunerkrankung der DCM-Patienten und der Verteilung der Genotypen des CTLA-4-CT60-Polymorphismus AA, AG und GG in Form eines Säulendiagramms dargestellt (Abbildung 30).

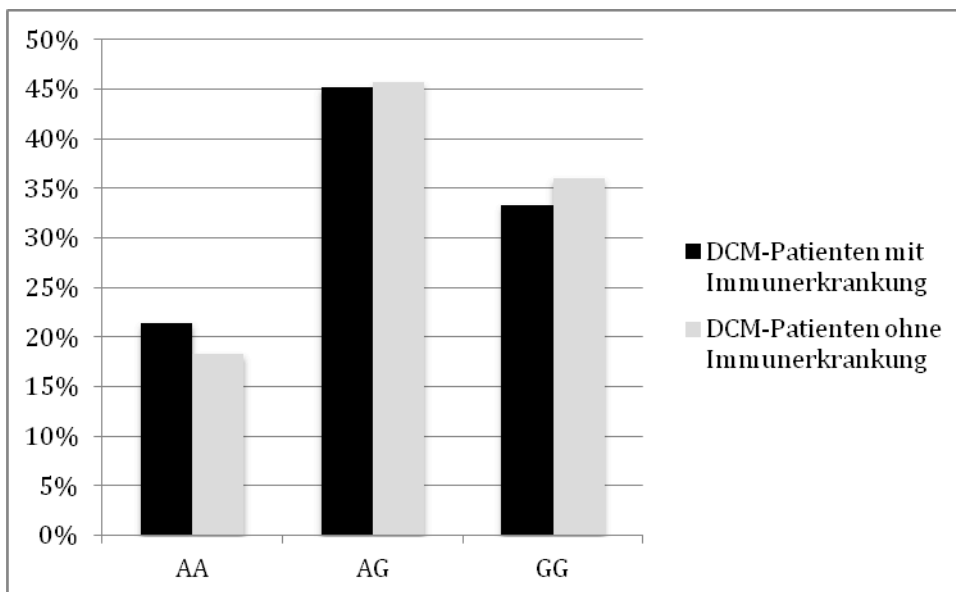


Abb. 30: Genotypverteilung des CTLA-4-CT60-SNP in DCM-Patienten mit und ohne Immunerkrankung in Prozentangaben

Der mittels Chi-Quadrat-Test berechnete p-Wert betrug 0,878 (Chi-Quadrat-Wert=0,26, df=2). Damit bestand keine signifikante Assoziation zwischen den Genotypen des CTLA-4-CT60-Polymorphismus und dem Vorhandensein einer komorbiden Immunerkrankung bei DCM-Patienten.

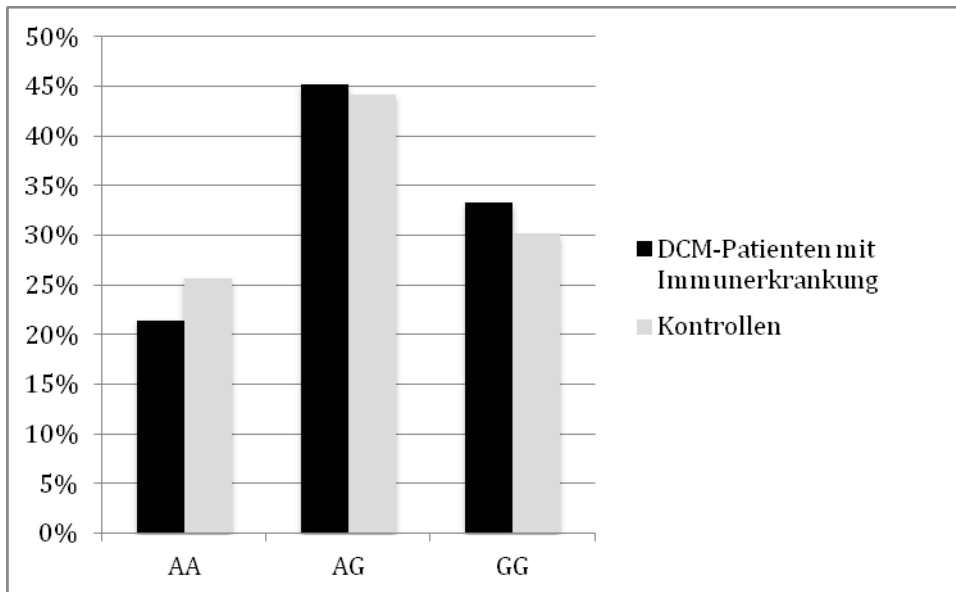


Abb. 31: Genotypverteilung des CTLA-4-CT60-SNP in DCM-Patienten mit Immunerkrankung und der Kontrollgruppe

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob zwischen der Population von DCM-Patienten mit gleichzeitiger Immunerkrankung und gesunden Blutspendern ein Unterschied hinsichtlich der Genotypfrequenz bestand (Abbildung 31). Allerdings konnte auch hierbei ein solcher Zusammenhang zwischen den genannten Kollektiven nicht gesichert werden ($p=0,813$, Chi-Quadrat-Wert=0,41, $df=2$).

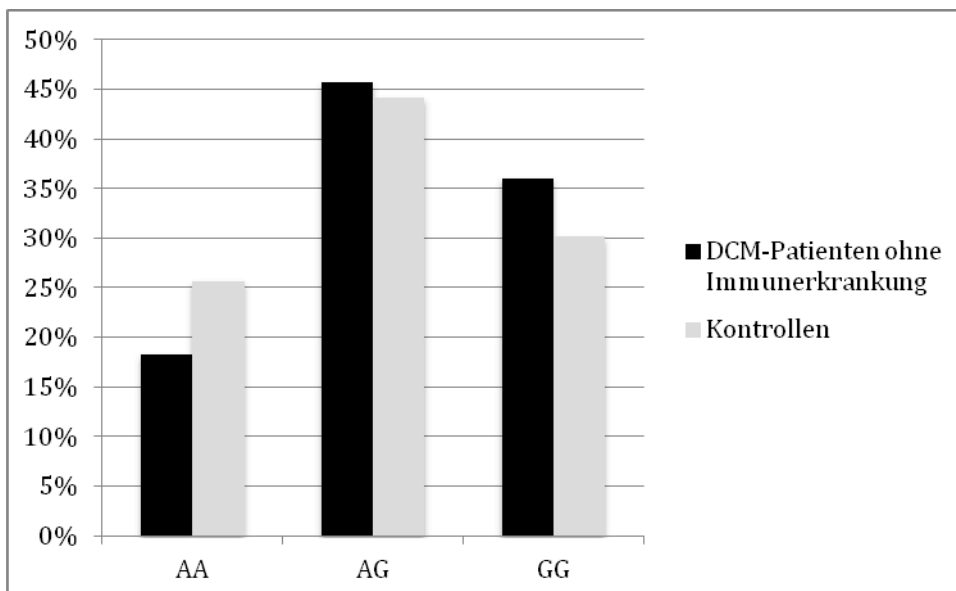


Abb. 32: Genotypverteilung des CTLA-4-CT60-SNP in DCM-Patienten ohne Immunerkrankung und dem Kontrollkollektiv

Ebenso konnte keine Signifikanz im Vergleich der beiden Gruppen von DCM-Patienten ohne komorbide Immunerkrankung und den gesunden Kontrollpersonen festgestellt werden (Abbildung 32). Zwar fand sich der GG-Genotyp bei den Patienten mit 36% häufiger als in den Kontrollen (30%), doch zeigt dies aufgrund einem p-Wert von $>0,05$ nur eine Tendenz an ($p=0,075$, Chi-Quadrat-Wert=5,18, $df=2$).

3.2. Untersuchung des +49-Polymorphismus

3.2.1. PCR-Produkte des +49-Polymorphismus

Die für den CTLA-4-+49-Polymorphismus verwendeten Primer amplifizierten ein DNA-Fragment, das nach der PCR auf einem Agarose-Gel aufgetrennt wurde. Inklusive der Primer und der GC-Klammer betrug die Länge des PCR-Produkts 243 Basenpaare und entsprach damit den Erwartungen (Abbildung 33).

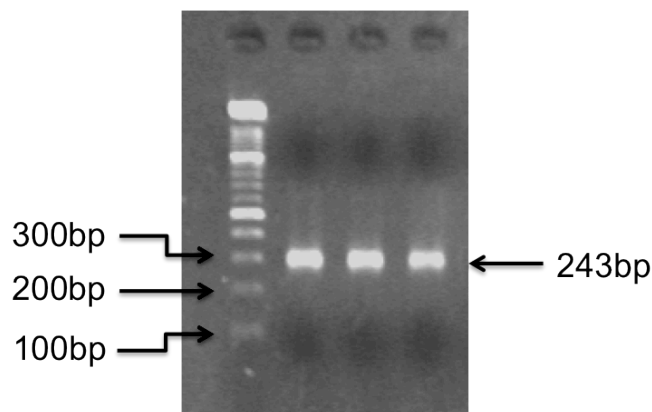


Abb. 33: Gelelektrophorese mit PCR-Produkten des +49-Polymorphismus mit einer Länge von 243bp.

3.2.2. DGGE des +49-Polymorphismus

Die PCR-Produkte wurden anschließend auf ein DGGE-Gel aufgetragen. Wie in Abbildung 34 beispielhaft dargestellt, konnte mittels der entstandenen Bandenkonstellationen die Genotypisierung der Proben erfolgen.

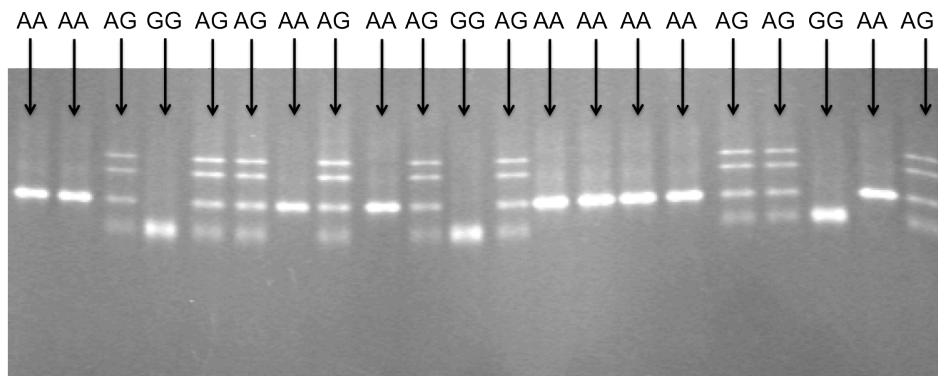


Abb. 34: DGGE mit PCR-Produkten des CTLA-4-+49-Polymorphismus

3.2.3. Verteilung der Genotypen des +49-Polymorphismus

Die Genotyp- bzw. Allelverteilung des CTLA-4-+49-Polymorphismus ist zunächst in Tabelle 15 und anschließend in Form eines Balkendiagramms in Abbildung 35 dargestellt. Die Signifikanztestung wurde mittels des Chi-Quadrat-Tests durchgeführt. Die dazu gehörigen Ergebnisse sind unter dem jeweiligen Diagramm abgebildet.

Tabelle 15: Verteilung der Genotypen des CTLA-4-+49-Polymorphismus

	DCM Marburg 2	Kontrollen
Gesamt (n)	152	221
+49A/+49A	54 (35%)	92 (42%)
+49A/+49G	74 (49%)	113 (51%)
+49G/+49G	24 (16%)	16 (7%)

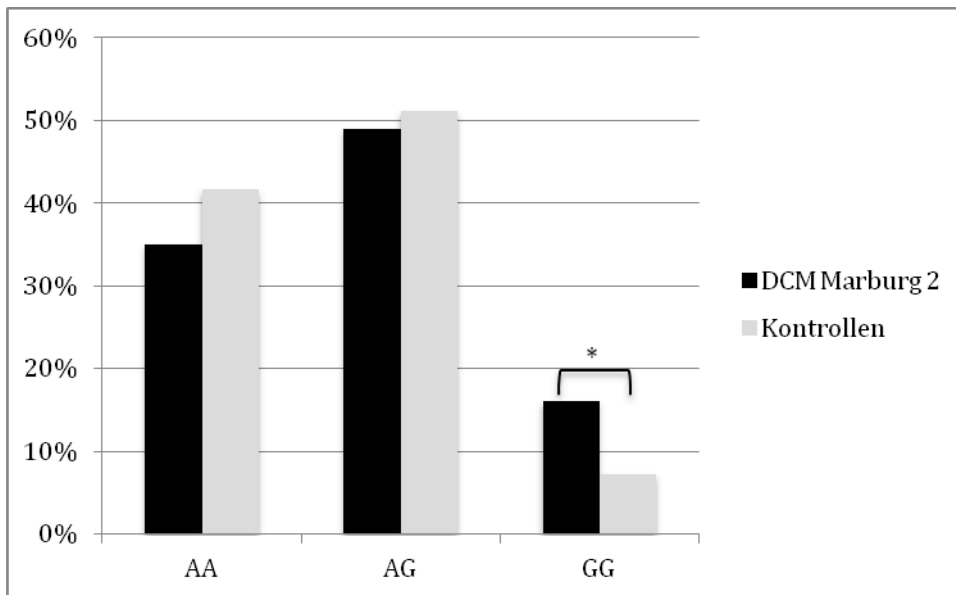


Abb. 35: Genotypverteilung des +49-Polymorphismus in der Kohorte der DCM-Patienten Marburg 2 und in der Kontrollgruppe. Der Genotyp GG findet sich in der DCM-Gruppe Marburg 2 signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe ($p < 0,05$ mit eckiger Klammer markiert)

Der mittels Testanalyse errechnete p-Wert betrug 0,029 (Chi-Quadrat-Wert=0,09, $df=2$). Damit besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der Genotypverteilung in der DCM-Patientengruppe Marburg 2 und der Kontrollgruppe. Der Genotyp GG wurde mit 16% in der Patientenkohorte signifikant häufiger detektiert als bei den Kontrollen (7%). Die Genotypen AA und AG dagegen traten mit 35% und 49% seltener in der DCM-Kohorte auf als bei den Kontrollen (42% bzw. 51%)

In Tabelle 16 ist die Analyse der Allelfrequenzen des CTLA-4-+49-SNP aufgeführt.

Tabelle 16: Allelfrequenzen des +49-Polymorphismus

	DCM Marburg 2	Kontrollen
Gesamt (n)	304	442
+49A	182 (60%)	297 (67%)
+49G	122 (40%)	145 (33%)

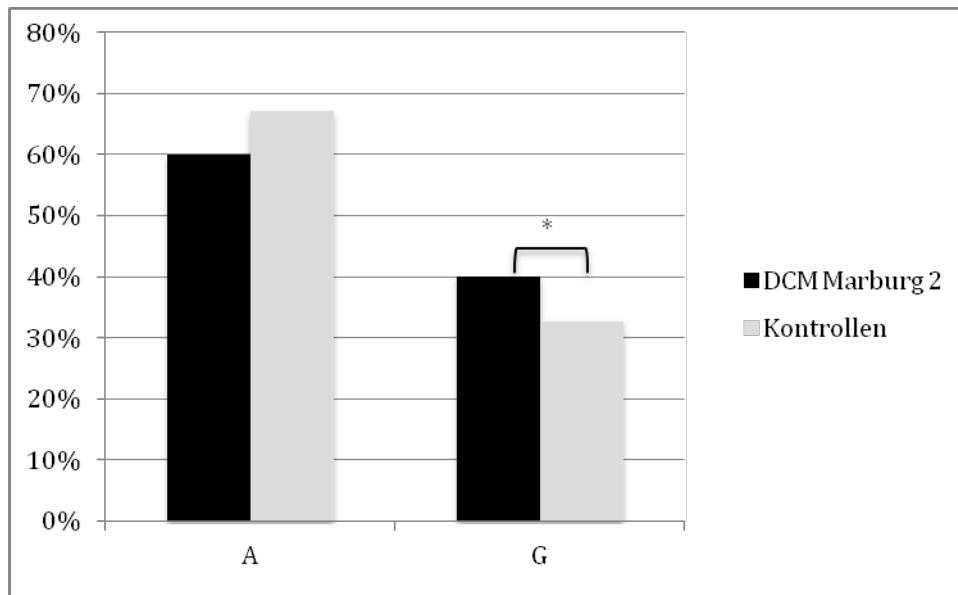


Abb. 36: Allelverteilung des CTLA-4-+49-Polymorphismus in den Studienkollektiven DCM-Patienten Marburg 2 und gesunden Kontrollen. Das G-Allel findet sich in der DCM-Gruppe Marburg 2 signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe ($p < 0,05$ mit eckiger Klammer markiert)

Auch die Allelfrequenzen unterschieden sich mit einem berechneten p-Wert von $< 0,05$ signifikant zwischen den DCM-Patienten des Kollektivs Marburg 2 und den gesunden Kontrollpersonen ($p = 0,037$, Chi-Quadrat-Wert=4,35, $df=1$). So zeigte sich das G-Allel mit 40% signifikant häufiger in der DCM-Kohorte als bei den Kontrollen (33%). Mit einem Prozentsatz von 60% konnte das A-Allel dagegen seltener bei den DCM-Patienten als im Kontrollkollektiv detektiert werden (67%). Die entsprechende graphische Darstellung der Allelverteilung des CT42-SNP in der DCM-Kohorte Marburg 2 kann der Abbildung 36 entnommen werden.

3.2.4. Analyse des +49-Polymorphismus im Marburger Patientenkollektiv

3.2.4.1. Gemessene Parameter in der Marburger Patientenkohorte

In die Untersuchung des +49-Polymorphismus bei DCM-Patienten flossen nur Daten der Gruppe DCM Marburg 2 ein, da das Kollektiv DCM Marburg 1 bereits in der Dissertation von Clarissa Struwe analysiert wurde. DCM Marburg 2 beinhaltete 152 Patienten, darunter 100 Männer (65,8%). Das mittlere Alter betrug bei Beginn der Studie $50 \pm 13,2$ Jahre. An begleitenden immunologisch vermittelten Krankheiten litten 29 Patienten, wobei einige Patienten von mehreren Immunkrankheiten betroffen waren: 6 Patienten litten an Nahrungsmittelallergie, 4 Patienten an Psoriasis, 1 Patient an Spon-

dylitis ankylosans, 1 Patient an rheumatoider Arthritis, 2 Patienten an chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, 7 Patienten an Asthma, 10 Patienten an allergischer Rhinitis, 3 Patienten an Neurodermitis, 1 Patient an Morbus Basedow und 1 Patient an Hashimoto-Thyreoiditis. Der mittlere LVEDD bei Studienbeginn betrug $66,35 \pm 7,2$ mm und die mittlere EF 30,1% mit einer Standardabweichung von 8,5%. Bei 124 DCM-Patienten der Studiengruppe wurde 12 Monaten nach der Diagnosestellung die klinische Untersuchung einschließlich einer echokardiographischen Messung der EF wiederholt und bei 113 Patienten der LVEDD erneut gemessen. Weitere Parameter, die von den DCM-Patienten aufgezeichnet wurden, waren Größe, Gewicht, Herzfrequenz, Angina-pectoris-Beschwerden, Einordnung des Herzinsuffizienzgrades nach der NYHA-Klassifikation, der Parvovirus-B19-Status und das Vorliegen einer familiären oder nicht-familiäre DCM. Auch wurde die Ejektionsfraktion während der Herzkatheteruntersuchung invasiv gemessen. Die Analyse der gemessenen Parameter wurde getrennt zwischen den intervallskalierten und ordinal- bzw. nominalskalierten Variablen berechnet. Intervallskalierte Variablen ließen sich mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf eine Normalverteilung und anschließend auf Signifikanzen mittels ANOVA- und Tukey-Test hin analysieren. Intervallskalierte Parameter wurden mit Box-Plot-Diagrammen graphisch dargestellt. Die Ordinal- und nominalskalierte Variablen wurden mittels Chi-Quadrat-Tests untersucht und in Form von Säulendiagrammen dargestellt.

3.2.4.2. Analyse der intervallskalierten Variablen des +49-Polymorphismus

Tabelle 17: Charakterisierung der Gruppe DCM-Patienten Marburg 1 in Bezug auf die Genotypen des CTLA-4-+49-SNP (Abkürzungen: MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung, N=Anzahl)

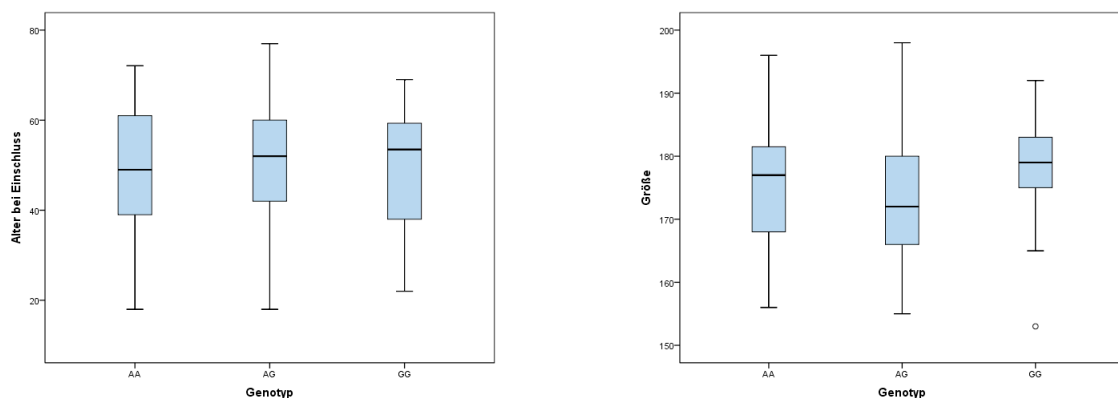
	AA			AG			GG			Gesamt		
	MW	N	SD	MW	N	SD	MW	N	SD	MW	N	SD
Alter	49,6	54	13,5	50,5	74	13,0	49,2	24	13,9	50,0	152	13,2
Größe	176	51	9,9	174	70	9,7	177	21	8,7	175,0	142	9,7
Gewicht	87,2	51	18,1	80,5	70	16,9	93,3	21	18,3	84,8	142	18,0
HF	78,0	47	12,2	74,7	67	15,4	78,0	21	16,2	76,3	135	14,5
EF invasiv	30,7	50	11,1	36,1	69	13,9	32,2	21	12,7	33,6	140	12,9
EF Echo Einschluss	30,8	53	8,4	29,7	72	8,5	29,9	24	9,2	30,1	149	8,5
EF Echo Follow-Up	43,3	46	12,6	41,0	59	13,8	39,3	19	10,6	41,6	124	12,9
LVEDD Einschluss	66,7	53	6,8	65,4	72	6,8	68,4	24	8,7	66,4	149	7,2
LVEDD Follow-Up	61,8	40	7,5	62,2	55	9,0	65,9	18	6,4	62,7	113	8,2

Um Signifikanzberechnungen von intervallskalierten Parametern durchführen zu können, ist es notwendig zu wissen, ob die in Tabelle 17 aufgeführten Werte normalverteilt sind. Dies lässt sich mithilfe von Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests berechnen, deren Ergebnisse in Tabelle 18 angegeben sind.

Tabelle 18: Ergebnisse des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests für den CTLA-4-+49-SNP (Abkürzungen: MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung, K.-S.-Zahl=Kolmogorov-Smirnov-Zahl, AS=Asymptotische Signifikanz, N=Anzahl)

	N	Parameter Normalverteilung		Extremste Differenzen			K.-S. Zahl	AS (2-seitig)
		MW	SD	Absolut	Positiv	Negativ		
Alter	152	45,0	13,2	0,06	0,04	-0,06	0,78	0,57
Größe	142	174,8	9,7	0,07	0,07	-0,07	0,81	0,53
Gewicht	142	84,8	18,1	0,10	0,10	-0,05	1,33	0,06
HF	135	76,3	14,5	0,07	0,07	-0,06	0,76	0,61
EF invasiv	140	33,6	12,9	0,07	0,07	-0,05	0,88	0,42
EF Echo Einschluss	149	30,1	8,5	0,12	0,06	-0,11	1,29	0,07
EF Echo Follow-Up	124	41,6	12,9	0,06	0,04	-0,05	0,65	0,80
LVEDD Einschluss	149	66,4	7,2	0,10	0,10	-,005	1,18	0,12
LVEDD Follow-Up	113	62,7	8,2	0,08	0,08	-0,05	0,86	0,46

Die Nullhypothese, in diesem Fall lautet sie, dass eine Normalverteilung der Variablen vorliegt, kann bei einem Wert von $p > 0,05$ nicht verworfen werden. Da alle Variablen einen Signifikanzwert von $p > 0,05$ besitzen, unterliegen folglich alle einer Normalverteilung und können im Folgenden mittels ANOVA- und Tukey-Test weiter analysiert werden. Zunächst erfolgt jedoch die graphische Darstellung der Variablen bezogen auf die Genotypen des CTLA-4-+49-Polymorphismus. Die intervallskalierten Parameter wurden durch Box-Plot-Diagramme veranschaulicht (Abbildung 37).



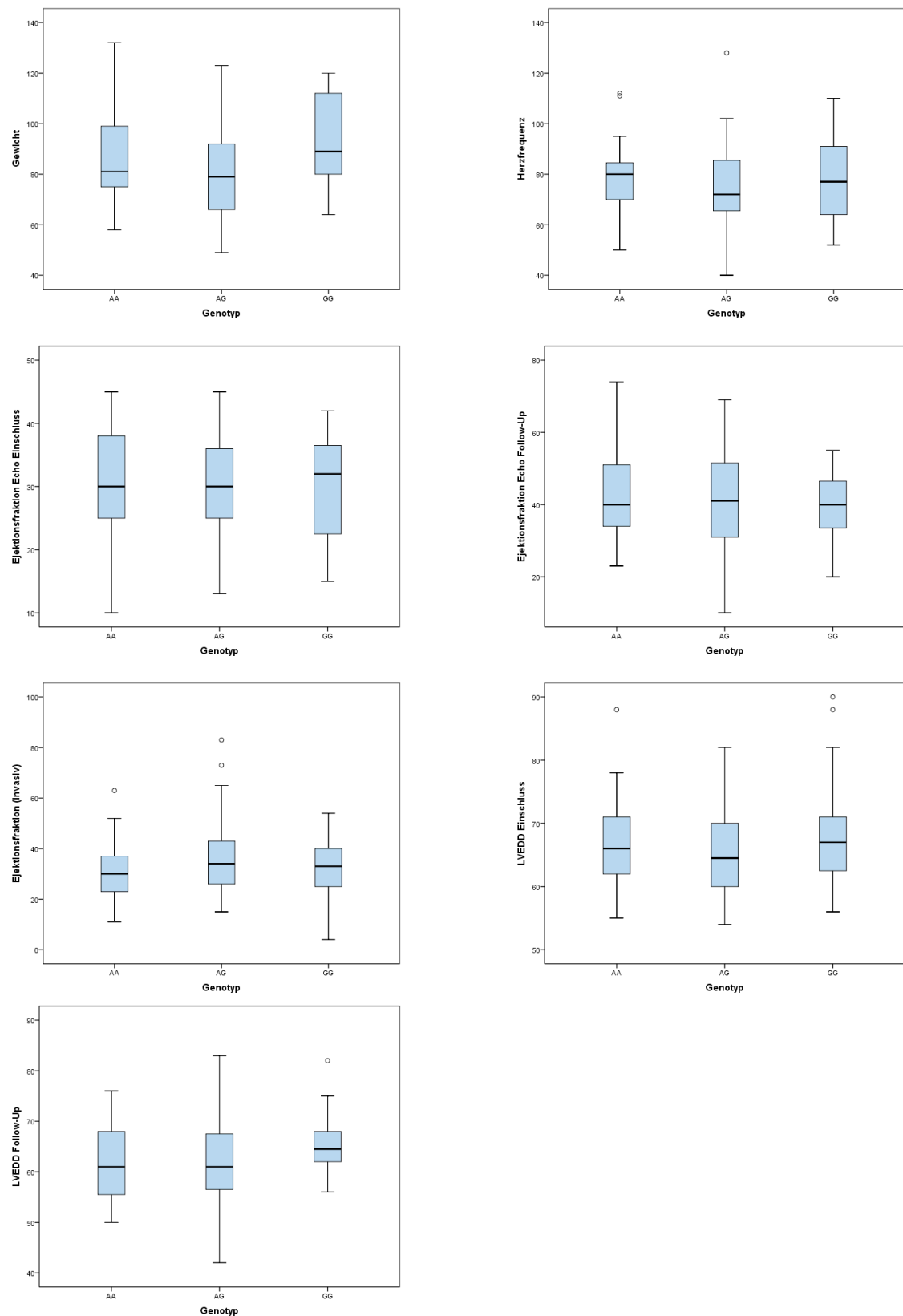


Abb. 37: Box-Plot-Diagramme klinischer und hämodynamischer Variablen in Abhängigkeit des +49-SNP-Genotyps

Mittels der Box-Plot-Diagramme ergab sich die Tendenz, dass die mittlere Ejektionsfraktion (EF) der Patienten mit dem +49-GG-Genotyp sowohl beim Einschluss als auch beim Follow-Up durchschnittlich geringer war als bei den Patienten mit dem +49-AA-Genotyp. Bei Studieneinschluss lag die EF einschließlich der Standardabweichung im Falle des +49-GG-Genotypes bei $30 \pm 9\%$ und beim +49-AA-Genotyp bei $31 \pm 8\%$. Zum Follow-Up-Zeitpunkt war die durchschnittliche EF beim +49-GG-Genotyp auf $39 \pm 11\%$ angestiegen und lag beim +49-AA-Genotyp bei $43 \pm 13\%$. Der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDD) erscheint bei Patienten mit einem GG-Genotyp im +49-Polymorphismus größer beim Einschluss und Follow-Up, als bei solchen mit einem AA-Genotyp (LVEDD Einschluss: +49-GG: 68 ± 9 mm, +49-AA: 67 ± 7 mm; LVEDD Follow-Up: +49-GG: 66 ± 6 mm, +49-AA: 62 ± 7 mm). Sowohl eine niedrigere EF als auch ein größerer LVEDD sind diagnostische Kriterien für eine Zunahme der Herzinsuffizienz bei DCM-Patienten. Es zeigte sich folglich bei DCM-Patienten mit dem +49-GG-Genotyp im Box-Plot-Diagramm tendenziell eine ausgeprägtere Beeinträchtigung der linksventrikulären Funktion, als bei Patienten, die den +49-AA-Genotyp trugen.

Ob tatsächliche signifikante Unterschiede zwischen den drei Genotypengruppen des CTLA-4-+49-Polymorphismus AA, AG und GG bezogen auf die gemessenen intervallskalierten normalverteilten Variablen vorlagen, wurde zunächst durch ANOVA-Tests (Tabelle 19) analysiert.

Tabelle 19: ANOVA-Test der Variablen des CTLA-4-+49-SNP (Abkürzungen: df=Freiheitsgrad, F=Teststatistik aus der Varianzanalyse)

		Quadrat-summe	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Alter	Zwischen den Gruppen	42	2	21	0,1	0,9
	Innerhalb der Gruppen	26255	149	176		
	Gesamt	26298	151			
Größe	Zwischen den Gruppen	257	2	129	1,4	0,3
	Innerhalb der Gruppen	12913	139	93		
	Gesamt	13170	141			
Gewicht	Zwischen den Gruppen	318	2	1554	5,1	0,008

	Innerhalb der Gruppen	4274	139	307		
	Gesamt	45822	141			
HF	Zwischen den Gruppen	364	2	182	0,9	0,4
	Innerhalb der Gruppen	27848	132	211		
	Gesamt	28212	134			
EF	Zwischen den Gruppen	880	2	440	2,7	0,071
	Innerhalb der Gruppen	22336	137	163		
	Gesamt	23215	139			
EF Echo Einschluss	Zwischen den Gruppen	39	2	19	0,3	0,8
	Innerhalb der Gruppen	10685	146	73		
	Gesamt	10723	148			
EF Echo Follow-Up	Zwischen den Gruppen	262	2	131	0,8	0,5
	Innerhalb der Gruppen	20150	121	167		
	Gesamt	20413	123			
LVEDD Einschluss	Zwischen den Gruppen	179	2	89	1,8	0,2
	Innerhalb der Gruppen	7393	146	51		
	Gesamt	7572	148			
LVEDD Follow-Up	Zwischen den Gruppen	227	2	114	1,7	0,2
	Innerhalb der Gruppen	7224	110	66		
	Gesamt	7452	112			

Als signifikant zu werten war lediglich die Verteilung des Körpergewichts zwischen den drei Genotypen AA, AG und GG des CTLA-4-+49-Polymorphismus, mit einem p-Wert von 0,008. Die Tendenzen, die in den Box-Plot-Diagrammen zu erkennen sind, können folglich nicht als signifikant erachtet werden.

Um zu ermitteln, zwischen welchen der drei Genotypen ein signifikanter Unterschied in

der Gewichtsverteilung vorliegt, wurden anschließend Tukey-Tests berechnet, deren Ergebnisse in Tabelle 20 aufgelistet sind.

Tabelle 20: Tukey-Test des CTLA-4-+49-SNP

Abhängige Variable	Genotyp	Genotyp	Signifikanz
Alter	AA	AG	0,915
		GG	0,996
	AG	AA	0,915
		GG	0,916
	GG	AA	0,996
		AG	0,916
Größe	AA	AG	0,471
		GG	0,825
	AG	AA	0,471
		GG	0,301
	GG	AA	0,825
		AG	0,301
Gewicht	AA	AG	0,098
		GG	0,376
	AG	AA	0,098
		GG	0,011
	GG	AA	0,376
		AG	0,011
HF	AA	AG	0,462
		GG	1,000
	AG	AA	0,462
		GG	0,639
	GG	AA	1,000
		AG	0,639
EF	AA	AG	0,065
		GG	0,894
	AG	AA	0,065
		GG	0,447
	GG	AA	0,894
		AG	0,447
EF Echo Einschluß	AA	AG	0,757

	AG	GG	0,905
		AA	0,757
		GG	0,994
	GG	AA	0,905
		AG	0,994
EF Echo Follow-Up	AA	AG	0,624
		GG	0,486
	AG	AA	0,624
		GG	0,874
	GG	AA	0,486
		AG	0,874
LVEDD Einschluß	AA	AG	0,543
		GG	0,603
	AG	AA	0,543
		GG	0,169
	GG	AA	0,603
		AG	0,169
LVEDD Follow-Up	AA	AG	0,973
		GG	0,186
	AG	AA	0,973
		GG	0,219
	GG	AA	0,186
		AG	0,219

Der Tukey-Test bestätigt die Ergebnisse des ANOVA-Tests. Außer der Variable „Gewicht“ liegen keine weiteren Signifikanzen vor. Beim Gewicht unterscheiden sich die Werte zwischen den Genotypen AG und GG mit einem p-Wert von 0,011. Im entsprechenden Box-Plot-Diagramm ist zu erkennen, dass die DCM-Patienten mit dem CTLA-4-CT42-GG-Genotyp ein höheres Gewicht aufweisen, als solche mit dem +49-AG-Genotyp.

3.2.4.4. Analyse der Assoziation kardialer Parameter mit dem +49-SNP

In Tabelle 21 erfolgt zunächst eine Auflistung der erhobenen kardialen Variablen in Bezug auf die Genotypen des CTLA-4-+49-Polymorphismus.

Tabelle 21: Kardiale Parameter des Marburger DCM-Kollektivs in Bezug auf die Genotypen des CTLA-4-+49-SNP

		AA	AG	GG	Gesamt
NYHA	1	2 (17%)	9 (75%)	1 (8%)	12
	2	12 (35%)	17 (50%)	5 (15%)	34
	3	32 (40%)	38 (47%)	11 (44%)	81
	4	2 (33%)	1 (17%)	3 (50%)	6
	fehlend	6	9	4	19
Angina pectoris	atypisch	9 (33%)	12 (44%)	6 (22%)	27
	CCS1	3 (50%)	2 (33%)	1 (17%)	6
	CCS2	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	1
	CCS3	1 (33%)	1 (33%)	1 (33%)	3
	keine AP	32 (38%)	43 (51%)	10 (12%)	85
	fehlend	9	15	6	30
familiäre/nicht-familiäre DCM	familiär	12 (39%)	13 (42%)	6 (19%)	31
	nicht-familiär	42 (35 %)	61 (50%)	18 (15%)	121
	fehlend	keine	keine	keine	keine
Parvovirus B19	positiv	17 (44%)	16 (41%)	6 (15%)	39
	negativ	35 (33%)	53 (50%)	17 (16%)	205
	fehlend	2	5	1	8

Die Aufteilung der NYHA-Klassen in Abhängigkeit vom Genotyp des CTLA-4-CT42-Polymorphismus gibt die Abbildung 38 wider.

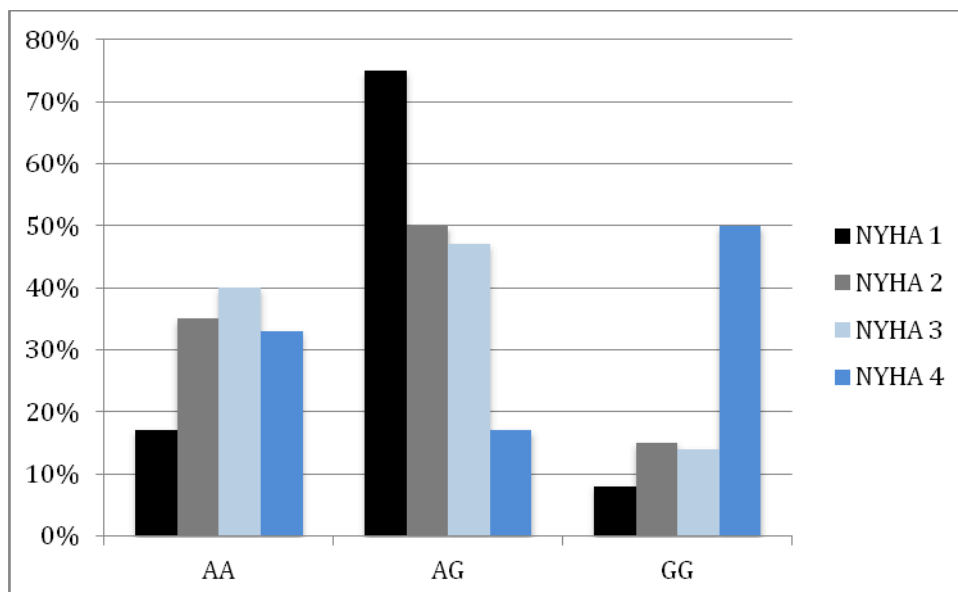


Abb. 38: NYHA-Stadien in Abhängigkeit vom Genotyp des CTLA-4-+49-Polymorphismus innerhalb des Marburger DCM-Kollektivs

Bei der Bestimmung des klinischen Ausmaßes der Herzinsuffizienz anhand der NYHA-Klassifikation fiel auf, dass vergleichsweise viele Patienten mit dem AG-Genotyp keinerlei kardiale Symptomatik aufwiesen und deshalb in die NYHA-Gruppe 1 klassifiziert wurden (75% aller Patienten der NYHA-Gruppe 1). Demgegenüber zeigten nur 17% aller NYHA-Klasse-1-Patienten den AA-Genotyp und 8% den GG-Genotyp (Abb. 38). Umgekehrt befanden sich in der Gruppe der DCM-Patienten mit schweren kardialen Symptomen (NYHA-Gruppe 4) zu 50% Patienten mit dem GG-Genotyp, wohingegen nur 17% dieser Patientengruppe den Genotyp AG und 33% den Genotyp AA besaßen. Die Berechnung des p-Werts mittels Chi-Quadrat-Test ergab jedoch einen Wert von $p=0,129$ (Chi-Quadrat-Wert=9,91, $df=6$) und erreichte damit keine Signifikanz.

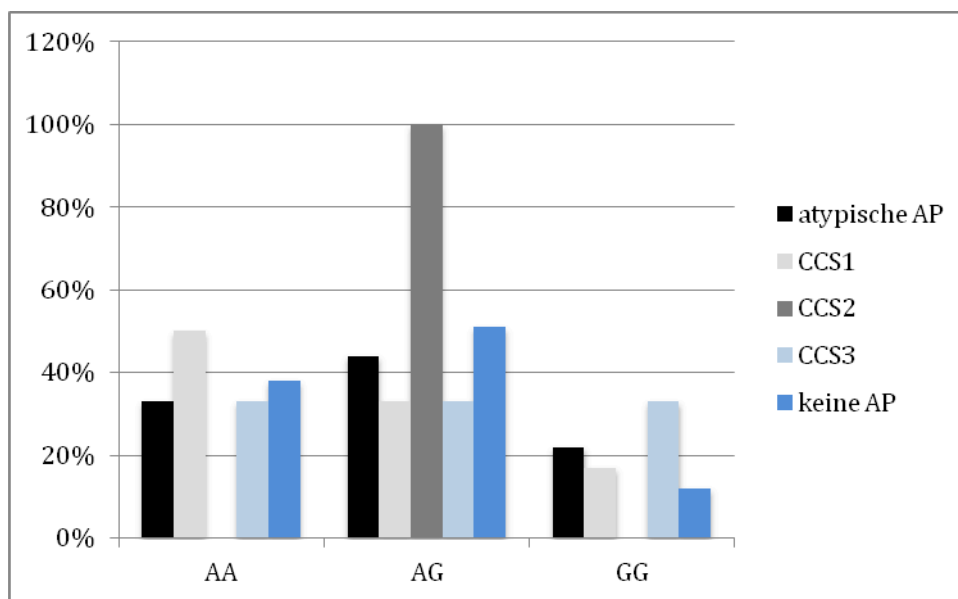


Abb. 39: Angina-pectoris-Beschwerden in Abhängigkeit vom Genotyp des CTLA-4-+49-Polymorphismus innerhalb des Marburger DCM-Kollektivs in Prozent

Im Vergleich der +49-Genotypen in Bezug auf Angina-pectoris-Beschwerden mittels der CCS-Klassifikation (Abbildung 39) stach das ausschließliche Auftreten der DCM-Patienten mit dem AG-Genotyp in der CCS2-Gruppe hervor (100%). Außerdem fiel auf, dass unter der Gruppe der DCM-Patienten, die von keinen Angina-pectoris-Symptomen berichteten, der Anteil der Patienten mit dem GG-Genotyp vergleichsweise klein war (12%). Dagegen besaßen 38% der Patienten ohne Angina-pectoris-Beschwerden den AA-Genotyp und 51% den AG-Genotyp. Innerhalb der DCM-Patientengruppe mit schwerer Angina-Pectoris-Symptomatik (CCS3) waren die drei Genotypen des +49-Polymorphismus gleichmäßig vertreten (je 33%). Die Signifikanzberechnung mittels Chi-Quadrat-Test erbrachte einen p-Wert von 0,896 (Chi-Quadrat-Wert=4,927, $df=10$). Damit lässt sich die Nullhypothese nicht ablehnen und folglich besteht kein

signifikanter Unterschied zwischen den Angina-pectoris-Beschwerden der Marburger DCM-Patienten der Gruppe 2 aufgrund ihrer Genotypzugehörigkeit.

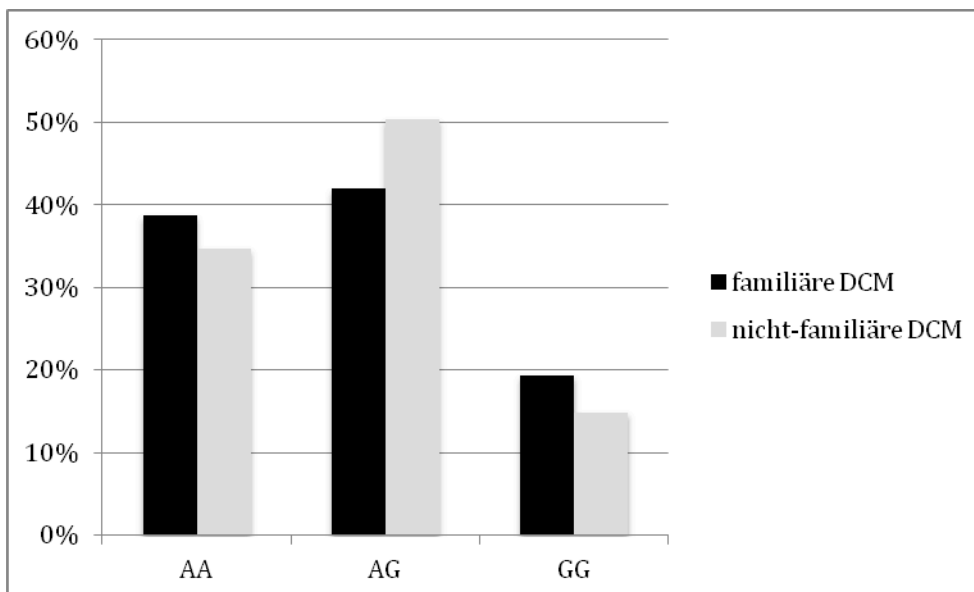


Abb. 40: Abhängigkeit der DCM-Genese (familiär/nicht-familiär) vom Genotyp des CTLA-4-+49-Polymorphismus innerhalb des Marburger DCM-Kollektivs in Prozent

Die Häufigkeiten der +49-Genotypen in Bezug auf das Vorhandensein einer familiären DCM zeigte keine Auffälligkeiten (Abbildung 40). Sowohl unter der Gruppe der familiären DCM-Patienten als auch unter den nicht-familiären DCM-Patienten fand sich der AG-Genotyp am häufigsten (42% bzw. 50%). Der GG-Genotyp trat jeweils selten auf (19% bzw. 15%). Der mithilfe des Chi-Quadrat-Tests errechnete p-Wert lag oberhalb des gesetzten Signifikanzniveaus von $p < 0,05$ ($p = 0,674$, Chi-Quadrat-Wert = 0,789, $df = 2$). Somit besteht, mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 5%, kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Genotyp des CTLA-4-+49-SNP und der Familiarität der DCM innerhalb des untersuchten Marburger DCM-Patientenkollektivs.

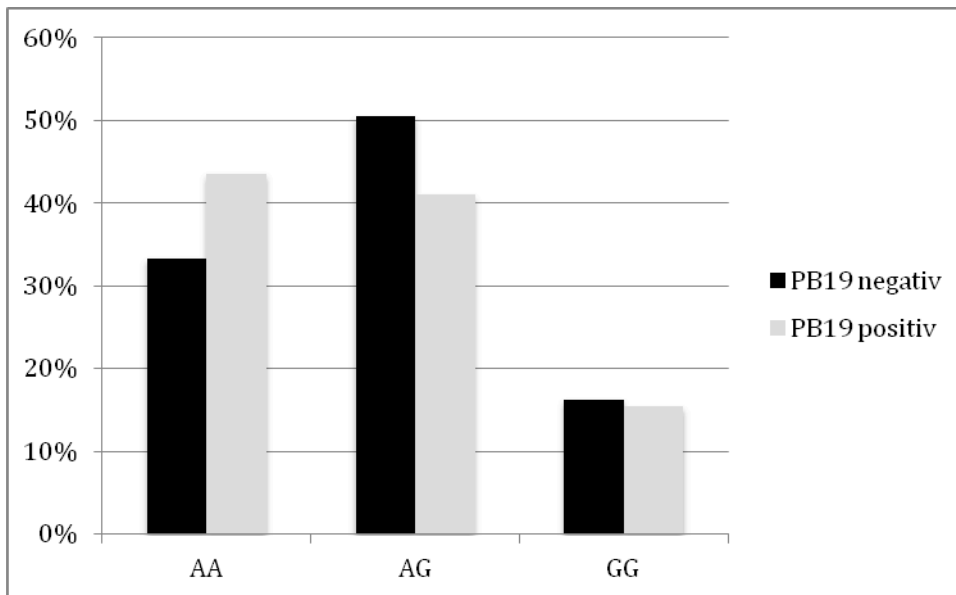


Abb. 41: Parvovirus-B19-(PB19)-Nachweis in Abhängigkeit vom Genotyp des CTLA-4-+49-Polymorphismus innerhalb des Marburger DCM-Kollektivs in Prozent

Der Nachweis von Parvovirus-B19-DNA in der Endomyokardbiopsie wurde ebenfalls in Bezug auf die drei Genotypen des +49-SNP untersucht (Abbildung 41). Obgleich die Hälfte (50%) der PB19-negativen Patienten und nur 41% der Virus-positiven-Patienten den AG-Genotyp aufwiesen, und bei 33% der Virus-negativen Patienten gegenüber 44% der Virus-positiven Patienten ein AA-Genotyp festgestellt wurde, war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant ($p=0,731$, Chi-Quadrat-Wert=2,028, $df=4$).

3.1.5. Verteilung der CTLA-4-+49-Genotypen in Abhängigkeit des Vorhandenseins einer Autoimmunerkrankung

In zahlreichen Studien wurde von einer Assoziation zwischen Immunerkrankungen, insbesondere Autoimmunerkrankungen, und dem CTLA-4-+49-GG-Genotyp berichtet (siehe Diskussion). Da in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine Häufung des GG-Genotyps bzw. G-Allels bei DCM-Patienten zu beobachten war, wäre es möglich, dass dies nur auf das zusätzliche Vorliegen von Autoimmunerkrankungen bei den untersuchten Patienten zurückzuführen ist. Um diesen möglichen Bias auszuschließen, wurde zuletzt analysiert, wie sich die Genotypverteilung zwischen DCM-Patienten mit und ohne komorbide Immunerkrankung im Vergleich zur Kontrollgruppe verhält. Die Häufigkeiten und Prozentzahlen zur Genotypverteilung in Bezug auf komorbide Autoimmunerkrankungen sind in Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22: Genotypverteilung des CTLA-4-+49-Polymorphismus in Abhängigkeit zum Vorliegen einer Immunerkrankung bei DCM-Patienten

	DCM-Patienten mit Immunerkrankung	DCM-Patienten ohne Immunerkrankung	Kontrollen
Gesamt (n)	29	123	221
+49A/+49A	14 (48%)	40 (33%)	92 (42%)
+49A/+49G	12 (41%)	62 (50%)	113 (51%)
+49G/+49G	3 (10%)	21 (17%)	16 (7%)

In Abbildung 42 ist ein möglicher Zusammenhang zwischen einer zusätzlichen Immunerkrankung der DCM-Patienten und der Genotypverteilung des CTLA-4-+49-Polymorphismus in Form eines Säulendiagramms dargestellt.

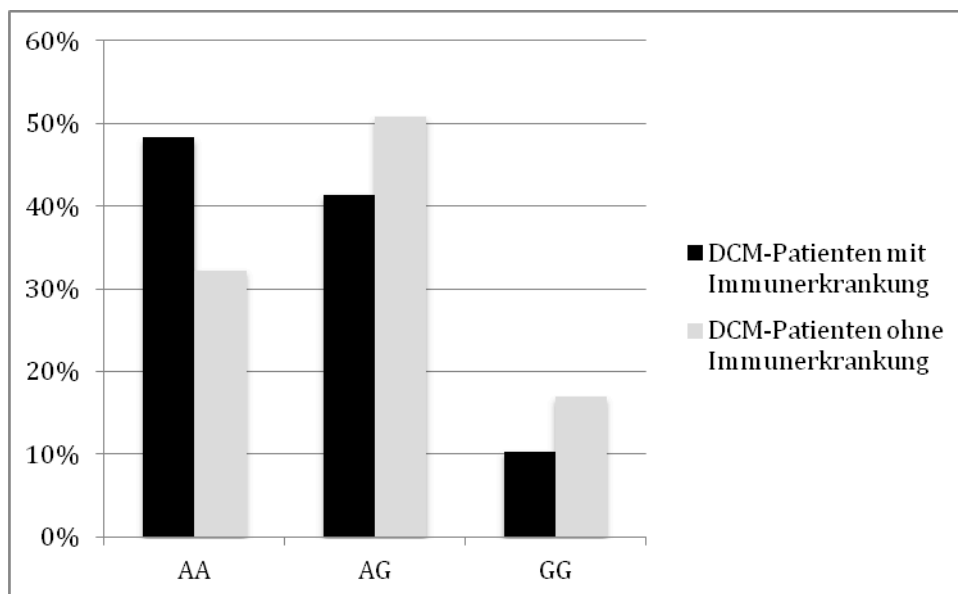


Abb. 42: Genotypverteilung des CTLA-4-+49-Polymorphismus in DCM-Patienten mit und ohne Immunerkrankung

Anhand des Säulendiagramms, dass das Vorhandensein einer komorbiden Immunerkrankung bei DCM-Patienten in Bezug auf die drei Genotypen des +49-Polymorphismus aufzeigt, fiel auf, dass der AA-Genotyp bei den DCM-Patienten mit Immunerkrankung häufiger vertreten war (48%) als die Genotypen AG (41%) und GG (10%). Unter den DCM-Patienten ohne komorbide Immunkrankheit trat dagegen der AG-Genotyp häufiger auf (50%) als der AA- (33%) und der GG- (17%) Genotyp. Die Sig-

nifikanztestung mittels Chi-Quadrat-Test ergab jedoch mit einem p-Wert von 0,259 (Chi-Quadrat-Wert=2,70, df=2) keine signifikante Assoziation zwischen dem Vorliegen einer Autoimmunerkrankung der untersuchten DCM-Patienten und dem Genotyp des CTLA-4-+49-SNP.

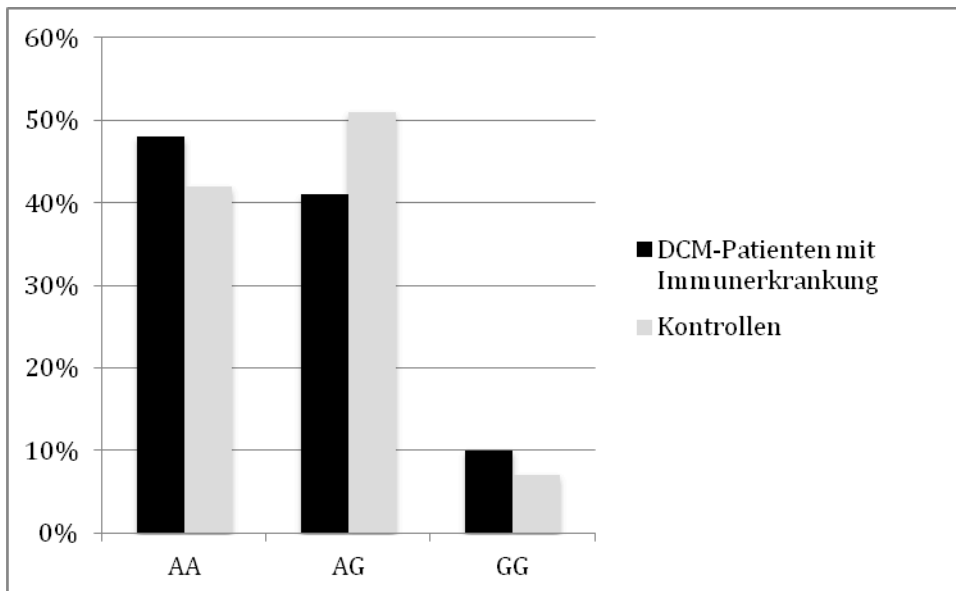


Abb. 43: Genotypverteilung des CTLA-4-+49-SNP in DCM-Patienten mit Immunerkrankung und in der Kontrollkohorte.

Der AA-Genotyp trat bei DCM-Patienten mit komorbider Immunerkrankung im Verhältnis häufiger auf (48%) als in der Kontrollkohorte (42%). Umgekehrt verhielt es sich mit dem AG-Genotyp, der im Kontrollkollektiv stärker vertreten war (51%) als bei den DCM-Patienten, die an einer Immunerkrankung litten (41%). Dieser Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz ($p=0,583$, Chi-Quadrat-Wert=1,08, df=2). Die zugehörigen Werte zur Genotypverteilung des CTLA-4-+49-SNP in DCM-Patienten mit Immunerkrankung und solchen in der Kontrollkohorte finden sich in Abbildung 43.

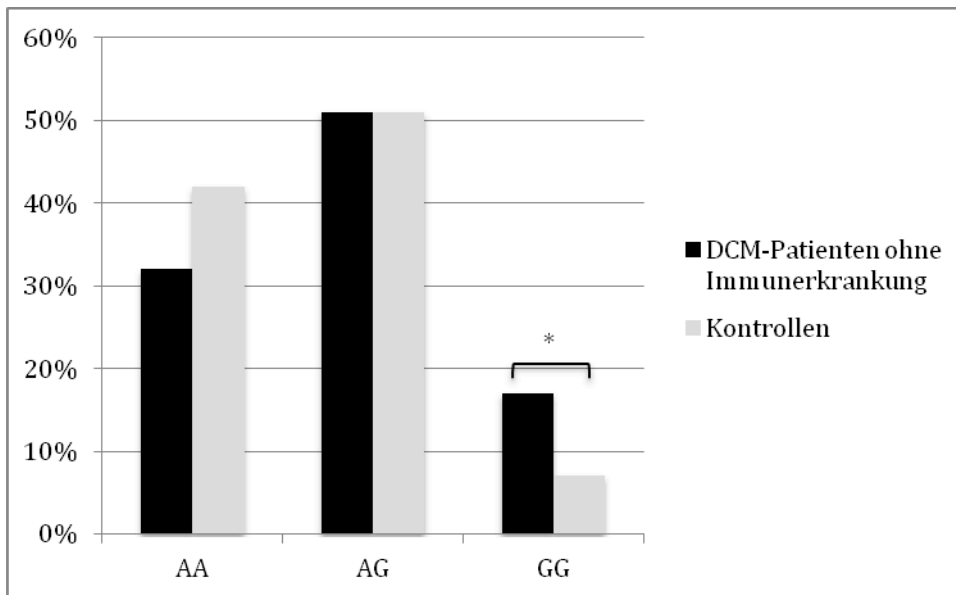


Abb. 44: Genotypfrequenz des CTLA-4-+49-SNP in DCM-Patienten ohne Immunerkrankung und in der Kontrollkohorte. Der Genotyp GG findet sich bei DCM-Patienten ohne Immunerkrankung signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe ($p < 0,05$ mit eckiger Klammer markiert)

Es ließ sich nachweisen, dass der GG-Genotyp des CTLA-4-+49-Polymorphismus signifikant häufiger in der DCM-Gruppe ohne komorbide Immunerkrankung vorkommt als in der Kontrollkohorte, da der mittels Chi-Quadrat-Test berechnete p-Wert 0,012 (Chi-Quadrat-Wert=8,85, df=2) betrug (Abbildung 42). Daraus ließ sich schließen, dass ein Bias aufgrund des zusätzlichen Vorkommens einer Autoimmunerkrankung bei den untersuchten DCM-Patienten unwahrscheinlich ist, da sogar in der Gruppe ohne begleitende Immunerkrankung der GG-Genotyp signifikant häufiger auftrat als bei den Kontrollen.

3.2. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Analyse des CTLA-4-CT60-Polymorphismus ergab keine signifikante Assoziation zwischen der Genotypverteilung und der DCM. Das CT60-G-Allel zeigte sich in der DCM Gruppe Marburg 1 signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe. Im gesamten DCM-Kollektiv war diese Assoziation jedoch nicht mehr nachzuweisen. Ein Zusammenhang zwischen der Klinik und dem Verlauf der DCM und den CT60-Genotypen bestand, außer einer erhöhten Herzfrequenz der Patienten mit dem GG-Genotyp, nicht. Dagegen konnte eine signifikante Häufung des CTLA-4-+49-GG-Genotyps und des +49-G-Allels bei DCM-Patienten demonstriert werden. Bezüglich der Symptomatik und des Verlaufs der DCM in Bezug auf die CTLA-4-+49-Genotypen deuteten die Box-Plot-

Diagramme zwar eine erniedrigte Ejektionsfraktion und einen höheren enddiastolischen Durchmesser bei Patienten mit dem +49-GG-Genotyp an, dieser Unterschied erreichte jedoch keine Signifikanz. Als signifikant stellte sich nur ein erhöhtes Körpergewicht bei DCM-Patienten mit dem GG-Genotyp heraus.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Zusammenhang zwischen zwei Polymorphismen des CTLA-4-Gens, dem CT60- und dem +49-Polymorphismus, und der dilatativen Kardiomyopathie untersucht. In diese klinisch-epidemiologische Studie wurden DCM-Patienten eingeschlossen, bei denen zuvor eine ausführliche Anamneseerhebung und eine gründliche körperliche Untersuchung unter Einschluss eines 12-Kanal-Elektrokardiogramms, Röntgen-Thorax, transthorakaler Echokardiographie sowie einer diagnostischen Koronarangiographie und Endomyokardbiopsie keine Hinweise auf das Vorliegen einer anderen kardialen Grunderkrankung erbracht hatten. Die diagnostischen Kriterien der dilatativen Kardiomyopathie wurden definiert als echokardiographisch ermittelte linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF) von $<45\%$ und/oder einem linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser (LVEDD) von >56 mm. Hierbei handelt es sich um objektive Diagnosekriterien, wie sie üblicherweise für Kollektive mit DCM-Patienten standardmäßig für klinische Studien verwendet werden. Die Kontrollgruppe wurde aus Personen gebildet, die zum Blutspenden an die Universitätsklinik nach Marburg gekommen waren, und bei denen eine umfassende körperliche Untersuchung keinen Anhalt für eine kardiale Erkrankung erbracht hatte. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen eine Assoziation des CT42-Polymorphismus von CTLA-4 mit der DCM und sind geeignet, die dilatative Kardiomyopathie in den Katalog der CTLA-4-assoziierten Erkrankungen aufzunehmen.

Die Pathogenese der DCM ist auch nach vielen Jahren der Forschung nicht vollkommen aufgeklärt. Man geht jedoch davon aus, dass die DCM nosologisch heterogen ist und phasenweise unter Beteiligung von autoimmunen Vorgängen verläuft. Eine Assoziation zwischen Polymorphismen des CTLA-4-Gens und der DCM könnte eine solche Annahme unterstreichen. Das auf stimulierten T-Zellen exprimierte CTLA-4-Molekül wirkt inhibierend auf die T-Zell-Funktion und hat somit eine hemmende Wirkung auf das Immunsystem. Diese Eigenschaft führte zu der Hypothese, dass CTLA-4 ein wichtiger Bestandteil der Selbsttoleranz ist und umgekehrt eine reduzierte CTLA-4-Oberflächenexposition eine Prädisposition für Autoimmunerkrankungen darstellt. In den letzten Jahren entstanden diverse Studien, die eine Assoziation zwischen Mutationen bzw. Polymorphismen im CTLA-4-Gen und Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise Diabetes mellitus, herstellen konnten. In der vorliegenden Arbeit wurde erstens geprüft, ob sich die Genotypen AA, AG und GG des CT60- (+6230) Polymor-

phismus und des CT42- (+49) Polymorphismus im CTLA-4-Gen zwischen Patienten mit DCM und Kontrollen unterscheiden und zweitens, ob der Genotyp von CTLA-4-SNPs die Schwere und den Verlauf der DCM beeinflussen kann.

In der Literatur finden sich zahlreiche Studien, die den Einfluss des CT60-Polymorphismus, teilweise auch in Kombination mit dem +49-Polymorphismus, auf unterschiedliche Autoimmunerkrankungen untersucht haben. Bei nicht wenigen extrakardialen Autoimmunkrankheiten wurden dabei widersprüchliche Ergebnisse publiziert. In einer holländischen Studie gaben Zhernakova *et al.* eine Assoziation zwischen einem CTLA-4-Haplotyp, der sowohl für den CT60- als auch den CT42-SNP das G-Allel beinhaltet, und Diabetes mellitus Typ 1 bekannt (Zhernakova *et al.*, 2005). Kawasaki *et al.* wiesen eine Häufung des CTLA-4-+6230-GG-Genotyps bei japanischen Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 nach (Kawasaki *et al.*, 2008).

Hunt *et al.* fanden einen Zusammenhang zwischen britischen Zöliakie-Patienten und einem CTLA-4-Haplotyp, der sowohl für den +6230- als auch den +49-SNP das G-Allel beinhaltet (Hunt *et al.*, 2005). Brophy *et al.* beschrieben ähnliche Ergebnisse in Irland und van Belzen *et al.* in Holland (Brophy *et al.*, 2006, van Belzen *et al.*, 2004). Gudjónsdóttir und Mitarbeiter konnten dies bei einer gemischt norwegischen und schwedischen bzw. King *et al.* bei einer englischen Kohorte nicht bestätigen (King *et al.*, 2003, Gudjónsdóttir *et al.*, 2009).

Eine Assoziation zwischen dem CT60-SNP und der primär biliären Zirrhose konnte von Walker *et al.* in Kanada gezeigt (Walker *et al.*, 2009), von Joshita *et al.* allerdings in Japan nicht bestätigt werden (Joshita *et al.*, 2010). Eine Haplotyp-Analyse zeigte eine Häufung der G-Allele von +49 und CT60 bei Patienten mit primär biliärer Zirrhose in einer japanischen (Joshita *et al.*, 2010), einer amerikanischen (Juran *et al.*, 2008) und einer kanadischen Population (Walker *et al.*, 2009). Auch konnte eine signifikante Assoziation zwischen dem CTLA-4-CT60-GG-Genotyp und japanischen Patienten mit autoimmuner Pankreatitis nachgewiesen werden (Umemura *et al.*, 2008). Han *et al.* demonstrierten eine Häufung des CTLA-4-+6230-GG-Genotyps und des -G-Allels bei Patienten mit Morbus Basedow im Vergleich zu einer Kontrollgruppe in einer chinesischen Studie (Han *et al.*, 2006). Weng und Kollegen gelangten zu vergleichbaren Ergebnissen in einer taiwanischen Population (Weng *et al.*, 2005). Takahashi und Kimura fanden eine Häufung des G-Allels bei Morbus-Basedow-Patienten mit positiven Autoantikörpern gegen den Thyroidea-stimulierenden-Hormon(TSH)-Rezeptor im Vergleich zu gesunden Probanden (Takahashi & Kimura, 2010). Der CT60-Polymorphismus wurde von Ueda und Mitarbeitern bei 1516 britischen Probanden als der am höchsten assoziierte SNP zu Morbus Basedow bezeichnet, auch wenn drei andere SNPs in der gleichen 6.1-kb Region des 3'-Endes von CTLA-4, JO31, JO30

und JO27-1, die Assoziation ebenfalls erklären könnten (Ueda et al., 2003). In einer Studie zum systemischem Lupus erythematoses in England konnte keine direkte Assoziation zum CT60-SNP nachgewiesen werden (Cunninghame Graham et al., 2006).

Daha et al. untersuchten den CT60-Polymorphismus bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) in einer holländischen Kohorte und führten außerdem eine Metaanalyse mit vier weiteren kaukasischen Studien durch. Sowohl ihre eigene Kohorte als auch die Metaanalyse zeigte eine signifikante Häufung des CT60-G-Allels bei Patienten im Vergleich zu Kontrollen (Daha et al., 2009). In einer großen kanadischen Studie mit 1140 RA-Patienten wurde ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang zum +6230-Polymorphismus hergestellt (Walker et al., 2009). Plenge et al. ermittelten vergleichbare Ergebnisse (Plenge et al., 2005). Suppiah et al. konnten in Nordirland dagegen keine Assoziation zur RA demonstrieren (Suppiah et al., 2006). Patienten, die an einer juvenilen idiopathischen Arthritis litten, zeigten in einer US-amerikanischen Studie ebenfalls keine Häufung des CTLA-4-+49-GG-Genotyps im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (Pralhad et al., 2008).

CTLA-4-+6230 scheint der Polymorphismus im CTLA-4-Gen mit der stärksten Assoziation zu ANCA-positiven Vaskulitiden (engl.: small vessel vasculitis, SVV) in einer britischen Studie zu sein. Zwar traten sowohl der +49-GG- als auch der CT60-GG-Genotyp signifikant häufiger bei Patienten auf, in einer Haplotyp-Analyse bestimmte jedoch das CT60-G-Allel die Prädisposition zur SVV (Kamesh et al., 2009). Die Arbeitsgruppe von Blomhoff gab eine positive Assoziation zwischen dem CT60-SNP und Morbus Addison bekannt (Blomhoff et al., 2004). Eine große Studie über Morbus Addison erbrachte dagegen keinen signifikanten Zusammenhang zum CTLA-4-CT60-SNP (Brozzetti et al., 2010). In einer Studie mit Multiple-Sklerose-Patienten bestand keine Assoziation zum CTLA-4-CT60-SNP (Greve et al., 2008). John et al. fanden allerdings eine signifikante Assoziation zwischen dem CT60-SNP und der Alopecia areata (John et al., 2011). Muro et al. präsentierten einen Zusammenhang zwischen dem CT60-G-Allel und einer gehäuften akuten Lebertransplantatabstoßung. Das langfristige Transplantatüberleben unterschied sich zwischen den CT60-Genotypen jedoch nicht (Muro et al., 2008). Zusammenfassend kann man sagen, dass es, trotz der zahlreichen Gegenbeispiele, wahrscheinlich erscheint, dass ein – wenn auch geringer – Zusammenhang zwischen dem CTLA-4-CT60-GG-Genotyp und dem Vorliegen von Autoimmunerkrankungen besteht. Veröffentlichungen über einen Zusammenhang zwischen dem CT60-SNP und der DCM existieren bisher noch keine. In der vorliegenden Arbeit konnte zwar eine Häufung des CT60-GG-Genotyps bei Patienten mit DCM gezeigt werden, sie erreichte allerdings nicht das Signifikanzniveau.

Neben diesen reinen Assoziationsstudien, zu der auch die vorliegende Arbeit gehört, existieren zahlreiche Untersuchungen darüber, wie der CT60-GG-Genotyp die Neigung zu Autoimmunerkrankungen bewirken könnte. Ueda et al. zeigten in ihrer Publikation, dass CT60 das Verhältnis der CTLA-4-Spleißformen sCTLA-4 und fl-CTLA-4 verändern könnte: Ruhende T-Zellen von Individuen mit dem Genotyp CT60-GG besaßen niedrigere sCTLA-4-mRNA-Konzentrationen als solche mit dem Genotyp CT60-AA (Ueda et al., 2003). Da sCTLA-4, genauso wie das vollständige flCTLA-4, inhibitorisch auf Leukozyten wirken kann (Oaks et al., 2000), zogen Ueda et al. die Schlussfolgerung, dass der prädisponierende +6230-GG-Genotyp die Effizienz des Spleißvorgangs beeinträchtigt und somit die Produktion von sCTLA-4 verringert. Die dezimierte Anzahl an sCTLA-4-Molekülen führe zu einer geringeren Blockierung der B7-Rezeptoren, die ihrerseits vermehrt CD28 binden können. Das Resultat sei eine erhöhte Effektor-T-Zell-Aktivität und damit eine Prädisposition für Autoimmunerkrankungen (Ueda et al., 2003). Kaartinen et al. bestätigten diese Erkenntnisse (Kaartinen et al., 2007). Auch Palacios et al. wiesen eine verringerte flCTLA-4-Expression bei Individuen mit dem CTLA-4-+6230-GG-Genotyp nach (Palacios et al., 2008). Damit übereinstimmend demonstrierten Purohit et al., dass die sCTLA-4-Konzentrationen im Serum von Diabetes-Typ-1-Patienten höher waren als die von gesunden Kontrollpersonen (Purohit et al., 2005).

Dagegen veröffentlichten die Arbeitsgruppen um Mayans, Anjos und Berry widersprechende Ergebnisse: die mRNA-Expressionslevel von sCTLA-4 und flCTLA-4 unterschieden sich in ihren Versuchen zwischen den +6230-Genotypen nicht (Mayans et al., 2007, Anjos et al., 2005, Berry et al., 2008, Purohit et al., 2005). Daraufhin postulierten Anjos und Kollegen, dass es einen anderen Mechanismus geben muss, wie der CT60-GG-Genotyp die Prädisposition für Autoimmunkrankheiten verursacht. Z.B. könne es zu Effekten auf die Transkription von anderen noch unbekannten Genen kommen. Möglich sei auch, dass der +6230-GG-Genotyp die CTLA-4-Expression zwar beeinflusst, aber nur im physiologischen Aktivierungszustand von T-Zellen in vivo (Anjos et al., 2005).

Einen alternativen Mechanismus, wie der CT60-SNP für Autoimmunerkrankungen prädisponieren könnte, stellten Atabani et al. vor. Sie analysierten, ob die CTLA-4-CT60-Genotypen einen Einfluss auf die Menge von Tregs haben. Sie kamen zu dem Resultat, dass bei gesunden Probanden mit dem CT60-AA-Genotyp signifikant mehr Tregs im peripheren Blut zirkulieren als bei Individuen mit dem CT60-GG-Genotyp. Da Tregs ein wichtiger Baustein der peripheren Toleranz sind, könnte eine verminderte Anzahl an Tregs autoreaktive Vorgänge triggern (Atabani et al., 2005). Gerold et al. verknüpften kürzlich die beiden Ansätze, wie der CTLA-4-CT60-GG-Genotyp autoreaktive

Vorgänge hervorrufen könnte. In ihren Experimenten fanden sie heraus, dass die geringere Konzentration oder der Verlust an sCTLA-4 ein Grund für die verringerte Funktion von Tregs ist. So wäre es folglich vorstellbar, dass es durch den CT60-GG-Genotyp zu einer verminderten sCTLA-4-Konzentration kommt, dadurch Tregs an Potenz verlieren und somit autoimmune Reaktionen nicht verhindern können (Gerold *et al.*, 2011).

Damit übereinstimmend konnte demonstriert werden, dass Patienten mit systemischem Lupus erythematoses (Crispin *et al.*, 2003) und Diabetes mellitus Typ 1 (Kukreja *et al.*, 2002) weniger Tregs in ihrem peripheren Blut aufweisen als gesunde Individuen. Für die vorliegende Arbeit interessant ist, dass dies auch bei DCM-Patienten gezeigt werden konnte (Li *et al.*, 2010, Tang *et al.*, 2010). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass man einige Subentitäten der DCM auf Autoimmunmechanismen zurückführen kann. Unter Berücksichtigung der Annahme, dass eine Dysfunktion von CTLA-4 die Entwicklung und Funktion von Tregs beeinträchtigen kann (Takahashi *et al.*, 2000), lässt sich die Hypothese aufstellen, dass eine CTLA-4-Mutation über eine sCTLA-4-Minderung und Treg-Fehlfunktion autoimmune Vorgänge in der Pathogenese der DCM verstärken könnte. Anders ausgedrückt könnte es den Tregs durch eine Fehlfunktion oder Zellzahlminderung erschwert sein, eine autoimmune Reaktion im Myokard effizient zu inhibieren, aus der dann das Bild der DCM resultieren würde (Tang *et al.*, 2010). Die vorliegende Arbeit hätte diese Annahme durch eine Häufung des CTLA-4-CT60-GG-Genotyps bei DCM-Patienten unterstützen können. Da diese aber statistisch nicht signifikant war, kann ein solcher Mechanismus aus den eigenen Daten nicht postuliert werden.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass es zwar wahrscheinlich erscheint, dass eine Assoziation zwischen dem CTLA-4-CT60-GG-Genotyp und der Prädisposition für Autoimmunerkrankungen besteht, die Ursache hierfür jedoch nicht abschließend geklärt ist. Möglicherweise bewirkt der +6230-GG-Genotyp eine Reduktion der Anzahl an Tregs im peripheren Blut (Atabani *et al.*, 2005), eine verminderte Expression von sCTLA-4 (Oaks *et al.*, 2000, Kaartinen *et al.*, 2007) oder beides (Gerold *et al.*, 2011). Sowohl einzeln als auch in Kombination würde es zu einer verringerten Hemmung von autoreaktiven T-Lymphozyten kommen. Da eine Überaktivierung von T-Zellen die Entwicklung einer Autoimmunreaktion triggern kann, wäre die Neigung von Individuen mit dem CT60-GG-Genotyp eine Autoimmunerkrankung zu entwickeln, durch beide Mechanismen erklärbar. Da die Resultate einiger Forschungsgruppen diesen hypothetischen Mechanismen jedoch widersprechen (Anjos *et al.*, 2005, Berry *et al.*, 2008), bleibt abzuwarten, wie diese Unstimmigkeiten aufgelöst werden.

Neben dem CT60-SNP ist auch der +49-Polymorphismus, an anderer Stelle CT42

genannt, Gegenstand der vorgelegten Arbeit. Es wurde untersucht, ob eine Häufung des CTLA-4-+49-GG-Genotyp bei DCM-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden besteht. Beim +49-G-Allel kommt es durch den Basenaustausch von Adenin zu Guanin zu einer Aminosäuresubstitution an Position 17 des CTLA-4-Signalpeptids mit Austausch von Threonin nach Alanin. Wie beim CT60-SNP existiert eine Vielzahl an Veröffentlichungen, die eine positive Assoziation zwischen dem CTLA-4-CT42-Polymorphismus und diversen Autoimmunerkrankungen belegen. Genauso gibt es aber auch Studien, die dem widersprechende Resultate erzielten. Erstmalig wurde 1996 von einer Assoziation des CTLA-4-+49-Polymorphismus zu Diabetes mellitus Typ 1 berichtet (Nisticò *et al.*, 1996). Chistiakov *et al.* konnten nachweisen, dass das CTLA-4-CT42-G-Allel mit Diabetes mellitus Typ 1 in einer russischen Kohorte assoziiert ist (Chistiakov *et al.*, 2001). Eine gemischt kanadische und deutsche sowie eine US-amerikanische Studie zeigten ebenfalls eine signifikante Häufung des +49-G-Allels bzw. GG-Genotyps bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 im Vergleich zu einer Kontrollkohorte (Donner *et al.*, 1997a, Donner *et al.*, 1997b, Zalloua *et al.*, 2004).

In einer Studie von Blomhoff *et al.* stellte das CTLA-4-+49-G-Allel keine Prädisposition für die Entwicklung eines Morbus Addisons dar (Blomhoff *et al.*, 2004). Brozzetti *et al.* führten dagegen sowohl eine eigene Studie mit italienischen Morbus-Addison-Patienten als auch eine Metaanalyse mit fünf europäischen Studien durch und gelangten zu dem Resultat, dass eine signifikante Assoziation zwischen dem CTLA-4-+49-GG-Genotyp und Morbus Addison besteht (Brozzetti *et al.*, 2010). Der Zusammenhang zwischen dem CTLA-4-CT42-SNP und Multipler Sklerose (MS) wurde von verschiedenen Studien untersucht, die zu unterschiedlichen Ergebnissen kamen. So konnten einige Autoren keine Assoziation nachweisen (Cizmarević, *et al.* 2011, (Lorentzen *et al.*, 2005, Greve *et al.*, 2008), andere fanden jedoch eine Häufung des GG-Genotyps bzw. des Haplotyps CT42G-CT60G bei MS-Patienten (Suppiah *et al.*, 2005). Heggarty *et al.* berichteten von einer Häufung des AA-Genotyps bei Patienten mit rezidivierender MS im Vergleich zu einer Kontrollkohorte (Heggarty *et al.*, 2007).

Fernández-Mestre *et al.* verglichen in Venezuela die +49-Genotypen von Patienten mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen (Myasthenia gravis, Pemphigus vulgaris und Psoriasis) gegenüber solchen mit infektiösen Erkrankungen (Chagas-Krankheit, Dengue-Fieber und Amerikanische kutane Leishmaniose) sowie einer Kontrollgruppe und konnten keine signifikanten Assoziationen finden (Fernández-Mestre *et al.*, 2009). Gudjónsdóttir *et al.* beobachteten eine moderate Korrelation der Ausprägung der Zöliakie mit dem GG-Genotyp (Gudjónsdóttir *et al.*, 2009). In einem brasilianischen Kollektiv konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem CTLA-4-CT42-SNP und Pemphigus foliaceus gezeigt werden (Pavoni *et al.*, 2006).

Die Suche nach einer Assoziation des +49-SNP zu den autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen (Morbus Basedow und Hashimoto-Thyreoiditis) ergab uneinheitliche Ergebnisse (Chistiakov & Turakulov, 2003). Kouki et al. demonstrierten in einer US-amerikanischen Studie, dass das CT42-G-Allel häufiger bei Patienten mit Morbus Basedow vorkommt als bei gesunden Probanden (Kouki et al., 2002). Die Arbeitsgruppen von Donner, Han, Weng und Yang et al. erlangten ähnliche Ergebnisse (Donner et al., 1997a, Donner et al., 1997b, Han et al., 2006, Yang et al., 2011, Weng et al., 2005). Marron und Kollegen sowie Chen und Mitarbeiter konnten dagegen keine signifikante genetische Kopplung zum Morbus Basedow nachweisen (Marron et al., 1997, Chen et al., 2000) und Sahin et al. nicht zur Hashimoto-Thyreoiditis (Sahin et al., 2009). 2007 führten Kavvoura et al. eine Metaanalyse bezüglich der Assoziation zwischen den CT42- und CT60-SNPs und autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen durch, die aus Studien der letzten Jahre bestand. Insgesamt werteten sie Daten von etwa 15 000 Probanden aus und konnten eine signifikante Assoziation des G-Allels von +49 und CT60 sowohl zum Morbus Basedow als auch zur Hashimoto-Thyreoiditis zeigen. Sie nahmen jedoch an, dass die Assoziation des +49-SNP vor allem durch das Kopplungsungleichgewicht (Linkage disequilibrium, LD) zu CT60 zustande kommt (Kavvoura et al., 2007).

Juran et al. zeigten, dass das CTLA-4-+49-G-Allel mit einer erhöhten Häufigkeit bei Patienten mit primär biliärer Zirrhose (PBC) zu finden war. Außerdem wiesen sie diesen Zusammenhang für den rs231725 Polymorphismus nach, einen SNP, der sich in der 3'-flankierenden Region des CTLA-4 Gens befindet. Da sich in der Haplotyp-Analyse in 6 von 7 häufigen Haplotypen (sogenannte „common Haplotypes“) das A-Allel des rs231725 fand, stellten die Autoren die Theorie auf, dass die Häufung des +49-G-Allel auf dem LD mit rs231725 beruhen könnte (Juran et al., 2008). Walker et al. demonstrierten ebenfalls eine positive Assoziation zwischen dem CT42-Polymorphismus und 481 PBC-Patienten in Kanada (Walker et al., 2009). In einer deutschen und einer englisch/italienischen Studie zur primär biliären Zirrhose konnte dagegen keine Assoziation mit dem +49-Polymorphismus nachgewiesen werden (Schott et al., 2007, Donaldson et al., 2007).

Der CTLA-4-CT42-GG-Genotyp wurde signifikant häufiger bei türkischen Vitiligo-Patienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe gefunden (Pehlivan et al., 2009). Ob ein Zusammenhang zwischen dem CTLA-4-+49-SNP und systemischem Lupus erythematoses (LE) besteht, ist dagegen umstritten. Einige Studien berichteten von einer positiven Assoziation des G-Allels bzw. GG-Genotyps zum LE (Ahmed et al., 2001, Pullmann et al., 1999), andere nicht (Barreto et al., 2004, Heward et al., 1999, Liu et al., 2001, Lee et al., 2001). Prahalad et al. konnten keine Assoziation zwischen dem

+49-SNP und der juvenilen idiopathischen Arthritis nachweisen (Prahalad et al., 2008). In einer Metaanalyse von Han et al. ergab sich ein signifikanter Zusammenhang des CTLA-4-CT42-GG-Genotyps zur rheumatoiden Arthritis bei Asiaten, aber nicht bei Europäern (Han et al., 2005).

In einem ungarischen Kollektiv bestand keine Assoziation zwischen dem CTLA-CT42-GG-Genotyp und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Magyari et al., 2007). Van Belzen und Kollegen untersuchten den +49-SNP bei Zöliakie-Patienten in den Niederlanden. Sie konnten keine Häufung des GG-Genotyps bei Patienten im Vergleich zu Kontrollen entdecken (van Belzen et al., 2004). Auch in einer slowakischen Studie erwies sich kein Zusammenhang (Dallos et al., 2008). Der CTLA-4-CT42-SNP scheint eine Prädisposition für die Alopecia areata in Zentraleuropa zu sein (John et al., 2011).

Auch wenn eine autoimmune Komponente in der Pathogenese zumindest in einigen Subentitäten der DCM als gesichert gilt, gibt es bisher erst eine auf Chinesisch verfasste Studie, die eine positive Assoziation zwischen der DCM und dem CTLA-4-+49-SNP in einer kleinen Kohorte von 48 Patienten nachwies (Liu et al., 2005). In ihrer Dissertation „Assoziationsuntersuchung bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie und Polymorphismen im CTLA4-Gen“ konnte Clarissa Struwe die Ergebnisse von Liu et al. bestätigen (Struwe, 2012). Die vorliegende Arbeit weist in einem zweiten kaukasischen DCM-Kollektiv ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der DCM und dem CTLA-4-CT42-Polymorphismus nach und kann somit die oben genannten Resultate bekräftigen. Zusammengenommen unterstützen diese Beobachtungen die Hypothese einer autoimmunen Pathogenese von Subentitäten der DCM.

Wie ließe sich diese Assoziation des CT42-Polymorphismus und der DCM mechanistisch erklären? Denkbar wäre, dass die übermäßige Stimulation des Immunsystems durch infiltrierende T-Zellen über eine Myozytolyse und Apoptose zu einem fortschreitenden Verlust von Kardiomyozyten führt. Aus dieser Schädigung des Herzens könnte dann letztlich eine DCM resultieren. Die bereits erwähnten Untersuchungen mit CTLA-4-Knock-out-Mäusen von Tivol et al. und Waterhouse et al. zeigten, dass die Haupttodesursache der Mäuse wahrscheinlich die T-Zell-Infiltration des Herzens ist (Tivol et al., 1995, Waterhouse et al., 1995). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte auch bei einigen DCM-Patienten der vorliegenden Studie eine Lymphozyteninfiltration des Myokards in der Endomyokardbiopsie nachgewiesen werden.

Genauso uneinheitlich wie die Ergebnisse der Studien, die eine Assoziation zwischen dem CTLA-4-CT42-GG-Genotyp und Autoimmunerkrankungen untersuchen, sind auch die Erkenntnisse, die bei der Suche nach einer Ursache für diese fragliche Assoziation gewonnen wurden. Anjos et al. wiesen *in vitro* nach, dass die Translokation des noch

unreifen CTLA-4 zum endoplasmatischen Retikulum zwar sowohl beim CTLA-4-+49-G-Molekül als auch beim CTLA-4-+49-A-Molekül korrekt ablief, etwa ein Drittel der CTLA-4-+49-G-Peptide jedoch nicht hinreichend glycosyliert wurden. Außerdem berichteten sie bei Individuen mit dem CTLA-4-+49-G-Allel von einer im Verhältnis geringeren Zahl an CTLA-4-Molekülen auf der Zelloberfläche im Vergleich zur Gesamtmenge an CTLA-4-Molekülen. Aus diesen Ergebnissen zogen die Autoren den Schluss, dass Individuen mit dem CTLA-4-CT42-G-Allel weniger CTLA-4 auf ihrer Oberfläche exprimieren und in der Folge eine Neigung zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen besitzen (Anjos et al., 2002). Maurer et al. verwendeten eine andere experimentelle Herangehensweise als Anjos et al., gelangten aber zur gleichen Schlussfolgerung. Die Autoren untersuchten gesunde Probanden mit einem +49-GG- und solche mit einem +49-AA-Genotyp. Sie fanden heraus, dass Individuen mit einem +49-GG-Genotyp nach Stimulation mit reifen dendritischen Zellen eine geringere Hochregulierung der Oberflächenexpression von CTLA-4 zeigten als Individuen mit dem +49-AA-Genotyp. Dies interpretierten Maurer et al. als eine durch den Mangel an CTLA-4 hervorgerufene Störung in der Hemmung der T-Zell-Aktivität. Dies führe zu einer verringerten peripheren Selbsttoleranz. Als Fazit postulierten sie, wie auch Anjos et al., dass Individuen mit einem CTLA-4-+49-GG-Genotyp eine erhöhte Neigung zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen besitzen (Maurer et al., 2002). Ähnliche Ergebnisse lieferten die Forschungsgruppen von Kouki et al. und Ligiers et al. (Ligiers et al., 2001, Kouki et al., 2000).

Kouki und Kollegen beobachteten jedoch keinen Unterschied zwischen der T-Zell Proliferation von Patienten mit Morbus Basedow und Hashimoto-Thyreoiditis auf der einen und gesunden Probanden auf der anderen Seite. Sie konnten allerdings nachweisen, dass sich die T-Zell-Proliferation von Patienten mit Morbus Basedow oder Hashimoto-Thyreoiditis durch die Gabe von blockierenden anti-CTLA-4-Antikörpern ineffektiver verstärken ließ als bei gesunden Probanden. Daraus schlossen Kouki et al., dass die inhibitorische Funktion von CTLA-4 in T-Zellen von Patienten geringer ausgeprägt ist als bei Gesunden (Kouki et al., 2000).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Weg, auf dem der CTLA-4-CT42-Polymorphismus Einfluss auf die Aktivität von CTLA-4 nimmt, noch lange nicht entschlüsselt ist. Möglicherweise kommt es beim CTLA-4-Molekül mit einem Alanin an Position 17 zu einer reduzierten Glycosylierung und damit zu einem verminderten Transport der CTLA-4-Moleküle zur Zelloberfläche. Dieser Mangel an CTLA-4-Molekülen wiederum könnte, wie beim CTLA-4-CT60-SNP, zu einer erhöhten Effektor-T-Zell-Aktivität führen und so die Entstehung von Autoimmunerkrankungen erleichtern. Aufgrund der widersprüchlichen Resultate der Assoziationsstudien ist jedoch nicht an-

zunehmen, dass der +49-SNP, genauso wenig wie der CT60-SNP, alleine für die Entwicklung einer Autoimmunerkrankung oder bestimmter Formen der DCM verantwortlich ist.

Viglietta et al. demonstrierten eine verringerte supprimierende Funktion der Tregs von Multiple-Sklerose-Patienten im Vergleich zu gesunden Individuen (Viglietta et al., 2004). Einige Forschungsgruppen beschrieben sogar eine verringerte Treg-Konzentration im peripheren Blut von Patienten mit Autoimmunerkrankungen im Vergleich zu gesunden Probanden, z.B. beim systemischen Lupus erythematoses (Crispin et al., 2003) und Diabetes mellitus Typ 1 (Kukreja et al., 2002). Die Arbeitsgruppen von Li und Tang erlangten ähnliche Resultate in Studien mit DCM-Patienten (Li et al., 2010, Tang et al., 2010). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass man zumindest einige Subentitäten der DCM gewissermaßen als eine Autoimmunerkrankung bezeichnen kann. Verknüpft man diese Annahme mit der Beobachtung, dass eine Dysfunktion oder Minderung von CTLA-4 die Entwicklung und Funktion von Tregs beeinträchtigen kann (Takahashi et al., 2000), lässt sich die Hypothese aufstellen, dass eine Mutation von CTLA-4 über eine Treg-Fehlfunktion autoimmune Vorgänge in der Pathogenese der DCM verstärken könnte. Daraus lässt sich ableiten, dass es den Tregs entweder durch funktionelle Defekte oder eine Abnahme der Zellzahl nicht möglich sein könnte, eine autoimmune Reaktion im Myokard effizient zu unterdrücken (Tang et al., 2010).

Neben den in dieser Dissertation untersuchten Polymorphismen, CT60 bzw. +6230 und CT42 bzw. +49, wurden auch für andere Polymorphismen des CTLA-4-Gens Assoziationen zu Autoimmunerkrankungen beschrieben. Vor allem sind hier der -318- und (AT)_n-Polymorphismus zu nennen. Der -318-SNP liegt in der Promotorregion am 5'-Ende des CTLA-4-Gens (siehe Abbildung 7). Er kann in Form des häufigeren Cytosin-Allels oder des selteneren Thymin-Allels vorliegen. Der -318-CC-Genotyp wurde bereits mit der Prädisposition zu Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht (Braun et al., 1998, Walker et al., 2009, Han et al., 2006). Umgekehrt konnten Wang et al. eine protektive Wirkung des -318-T-Alles nachweisen: Probanden mit dem -318-T-Allel zeigten eine erhöhte CTLA-4-Promotoraktivität, woraufhin es zu einer vermehrten Transkription von CTLA-4 kam. Dies könnte zur Folge haben, dass die Autoreaktivität der T-Zellen durch die vermehrte CTLA-4-Expression abgeschwächt wird und so ein Schutz gegen die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen vorliegt (Wang et al., 2002b). Anjos et al. konnten diese Ergebnisse unterstützen und wiesen eine höhere *In-vitro*-Transkription von CTLA-4 bei Individuen mit einem -318-T-Allel gegenüber solchen mit anderen Genotypen nach (Anjos et al., 2004). Neben diesen Studien, die eine Assoziation zwischen dem -318-Polymorphismus und Autoimmunerkrankungen

befürworten, gibt es auch zahlreiche widersprechende Ergebnisse (Heward *et al.*, 1998, Ahmed *et al.*, 2001, Prahalad *et al.*, 2008, Lee *et al.*, 2001).

Der Dinukleotid-repeat-(Wiederholungs)-Polymorphismus, (AT)_n, ist ein Mikrosatelliten-Polymorphismus und beginnt an Position +642 der 3'-UTR von Exon 4 des CTLA-4-Gens (siehe Abbildung 7). Er ist hoch polymorph und kann aus 7 bis 30 AT-Wiederholungen bestehen (Ligers *et al.*, 2001). Huang *et al.* zeigten, dass Probanden mit langen (AT)_n-Wiederholungen im CTLA-4-Gen hyperaktive T-Zellen besitzen, die die Prädisposition zu Autoimmunerkrankungen erklären könnten. Im Einklang damit wies die gleiche Forschungsgruppe nach, dass Patienten mit Wegener Granulomatose signifikant seltener homozygot für das kürzeste Allel waren als die Kontrollen (Huang *et al.*, 2000, Zhou *et al.*, 2004). Auch andere Studien berichteten von einer signifikanten Häufung der langen (AT)_n-Allele bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen, wie rheumatoide Arthritis oder systemischer Lupus erythematoses, im Vergleich zu Kontrollkohorten (Rodríguez *et al.*, 2002, Ahmed *et al.*, 2001). Damit übereinstimmend ermittelten Chen *et al.* in einer chinesischen Studie mit Morbus-Crohn-Patienten, dass das kurze 84bp-Allel signifikant seltener bei Patienten im Vergleich zu den Kontrollen auftrat (Chen *et al.*, 2011).

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen ist, dass lange (AT)_n-Allele zu einer instabilen CTLA-4-mRNA und somit zu einer reduzierten CTLA-4-Expression führen (Wang *et al.*, 2002a). Zu bedenken ist jedoch auch, dass ein starkes Kopplungsungleichgewicht (linkage disequilibrium, LD) zwischen dem (AT)_n-Polymorphismus und dem +49-SNP zu bestehen scheint (Piras *et al.*, 2005). Das kurze Allel des (AT)_n Polymorphismus ist häufig kombiniert mit dem A-Allel des +49-SNP und längere Allele des (AT)_n mit dem G-Allel des +49-SNP (Marron *et al.*, 1997, Ahmed *et al.*, 2001). So ist es schwierig zu entscheiden, ob die Assoziation der langen (AT)_n-Allele mit Autoimmunerkrankungen ursächlich auf den (AT)_n-Polymorphismus zurückzuführen ist oder nur durch das LD mit dem G-Allel des +49-SNP zustande kommt. Umgekehrt ist es natürlich auch denkbar, dass die Neigung von Individuen mit dem CTLA-4-+49-GG-Genotyp, eine Autoimmunerkrankung zu entwickeln, nur scheinbar durch ein LD zum (AT)_n-Polymorphismus besteht.

Die Assoziationsstudien der letzten Jahre, die sich mit den Polymorphismen des CTLA-4-Gens und Autoimmunerkrankungen befassten, lieferten wie beschrieben teilweise gegensätzliche Resultate. Ein Hauptproblem bei der Suche nach prädisponierenden SNPs für Autoimmunerkrankungen ist, dass ein starkes Kopplungsungleichgewicht (engl.: Linkage disequilibrium, LD) innerhalb der CTLA-4/CD28/ICOS-Region besteht. Von einem LD spricht man, wenn zwei Loci nicht weiter als 1cM (Centimorgan) voneinander entfernt liegen. Diese kurze Entfernung bewirkt, dass die

Wahrscheinlichkeit, dass es während der Meiose zu einer Rekombination kommt, sehr gering ist, nämlich bei 1% (Vyse & Todd, 1996). Wie in Kapitel 4.2.2. genauer beschrieben, gibt es Forschungsergebnisse, die darauf hinweisen, dass sowohl der -318-CC-Genotyp wie auch die langen Allele des (AT)_n-Polymorphismus eine verringerte CTLA-4-Expression zur Folge haben. Genauso existieren aber Erkenntnisse, dass die in dieser Arbeit behandelten Polymorphismen CT42 und CT60 solch eine negative Wirkung auf die CTLA-4-Expression haben können. So könnte also theoretisch jeder dieser vier bekannten Polymorphismen des CTLA-4-Gens durch eine verminderte CTLA-4-Expression die inhibierende Wirkung von CTLA-4 auf das Immunsystem abschwächen und dadurch eine Prädisposition für Autoimmunerkrankungen darstellen. Im Zusammenhang mit dem hohen LD in der CTLA-4-Region erscheint es schwierig zu entscheiden, welche SNPs tatsächlich mit Autoimmunerkrankungen assoziiert sind und bei welchen dieser Zusammenhang lediglich durch ihr LD an andere SNPs hervorgerufen wird (Kaartinen et al., 2007).

Neben dem Kopplungsungleichgewicht innerhalb von CTLA-4 gilt es auch das LD zwischen CTLA-4 und ICOS bzw. CD28 in Betracht zu ziehen. ICOS ist ein weiteres kostimulatorisches Molekül, das wie CTLA-4 nur auf aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird. Seine Funktion dagegen ähnelt der von CD28, da es ebenfalls eine fördernde Wirkung auf die T-Zell-Aktivität hat (Hutloff et al., 1999). Es wäre beispielsweise auch denkbar, dass die Polymorphismen des CTLA-4-Gens lediglich nur scheinbar im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen stehen, aber eigentlich noch unentdeckte Mutationen im CD28- oder ICOS-Gen für die Assoziation verantwortlich sind. Walker et al. analysierten in einer großen kanadischen Studie mit 1140 rheumatoide Arthritis- und 481 primär biliäre Zirrhosepatienten SNPs und Haplotypen im CTLA-4- und ICOS-Gen sowie im Bereich zwischen den beiden Genen. Sie konnten signifikante Assoziationen von diversen SNPs im Bereich der CTLA-4- und ICOS-Gene (inklusive den in dieser Arbeit untersuchten SNPs CT60 und CT42) nachweisen (Walker et al., 2009). Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass theoretisch jeder dieser assoziierten Polymorphismen, auch die des ICOS-Gens, entscheidend für den Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen sein könnte.

Mithilfe des LDs innerhalb von CTLA-4 und zwischen CTLA-4, CD28 und ICOS könnte man folglich die unterschiedlichen Ergebnisse der diversen genetischen Assoziationsstudien erklären. Butty et al. suchten in einer weltweiten Studie nach den häufigsten Haplotypen im CTLA-4/CD28/ICOS-Lokus. Der wichtigste Haplotyp in kaukasischen Populationen beinhaltet u.a. das CT60-A-Allel. Butty et al. stellten sich daraufhin die Frage, ob es plausibler wäre anzunehmen, dass der protektive Effekt auf Autoimmunerkrankungen auf den gesamten Haplotyp zurückzuführen sei, als lediglich auf

einen einzelnen SNP wie CT60 (Butty *et al.*, 2007). Diese Überlegung wird z.B. von den Erkenntnissen von Brophy und Mitarbeiter unterstützt, die in ihrer Studie mit Zöliakiepatienten zwei Haplotypen identifizierten, die signifikant häufiger in der Kontrollgruppe vorkamen und insgesamt voraussichtlich protektiver sind als die einzelnen SNPs. Diese Haplotypen beinhalteten sowohl das CT60-A-Allel als auch +49-A-Allel (Brophy *et al.*, 2006), die sich auch in der vorliegenden Arbeit als protektiv herausstellten (im Falle des CT60-A-Allels jedoch nicht signifikant). Auch Johnson *et al.* erarbeiteten häufige Haplotypen, u.a. für CTLA-4, die mit einer Häufigkeit von mehr als 5% in einer Population zu finden sind. Die Haplotypen beinhalteten fünf SNPs, mit deren Hilfe man in Assoziationsstudien die Variationen innerhalb eines Kopplungsungleichgewichtsblocks ermitteln kann. Johnson *et al.* nannten diese SNPs „haplotype-tagging“ SNPs (htSNPs). Sie schlugen vor, in Zukunft diese htSNPs zu untersuchen, um so Assoziationsstudien untereinander besser vergleichbar zu machen. Im CTLA-4-Gen gehört der +49-Polymorphismus dazu, CT60 jedoch nicht (Johnson *et al.*, 2001). Unterschiede in Assoziationsstudien lassen sich eventuell auch mit einem Populationsbias erklären. Ramírez-Soriano *et al.* demonstrierten, dass sich die Anordnungen der häufigen Haplotypen und die Häufigkeiten der SNPs zwischen den verschiedenen geographischen Gruppen, teilweise sogar innerhalb einer geographischen Gruppe, signifikant unterscheiden. Sie folgerten daraus, dass Fall-Kontroll-Studien die genetische Heterogenität zwischen und innerhalb von geographischen Gruppen dringend in ihre Bewertungen mit einberechnen müssen, besonders in Hinblick darauf, dass die Kontrollgruppe sehr genau in ihrer ethnischen Zugehörigkeit mit der Patientengruppe übereinstimmen sollte (Ramírez-Soriano *et al.*, 2005). Aus epidemiologischen Studien ist bekannt, dass jede Population einen Mutationspool besitzt, in dem einzelne Mutationen (z.B. Polymorphismen) alleine zumeist keinen messbaren Effekt hervorrufen, im Zusammenspiel mit anderen jedoch für autoimmune Reaktionen prädisponieren oder vor ihnen schützen könnten. Aus diesen Wechselwirkungen resultiert das individuell maßgebliche Risiko, eine Autoimmunerkrankung zu entwickeln und erklärt, warum diese Erkrankungen nicht klassisch nach Mendel vererbt werden, sondern einen komplexen, bisher unbekannten Vererbungsmodus besitzen. Außer diesen unterschiedlichen genetischen Voraussetzungen werden die einzelnen Populationen mit individuellen Umweltfaktoren konfrontiert, die bei der Entstehung von autoimmunen Vorgängen ebenfalls eine Rolle spielen und so widersprüchliche Resultate von Assoziationsstudien erklären können (Vyse & Todd, 1996). Die Metaanalyse von Han *et al.* ist ein Beispiel dafür, dass ein Polymorphismus in einer ethnischen Gruppe prädisponierend und in einer anderen nicht prädisponierend wirkt. Der CTLA-4-+49-GG-Genotyp zeigte sich bei Patienten mit rheumatoider Arthritis in Asien signifikant

häufiger als bei den Kontrollen, wobei dies in Europa nicht der Fall war (Han et al., 2005).

Ein weitere Begründung für unterschiedliche Ergebnisse in Assoziationsstudien könnten zu kleine Probandenzahlen sein. Dadurch fehlt es den Studien an Power, um signifikante und aussagekräftige Ergebnisse hervorzubringen (Brophy et al., 2006, Gough et al., 2005).

Unterschiedliche Ergebnisse in Assoziationsstudien könnten auch durch Gen-Gen-Interaktionen hervorgerufen werden. Polymorphismen verschiedener Gene ergeben gemeinsam ein höheres Risiko, eine Autoimmunerkrankung zu entwickeln, als alleine. Juran et al. und Einarsdottir et al. zeigten eine solche Assoziation zu verschiedenen Autoimmunerkrankungen zwischen CTLA-4-SNPs und $TNF\alpha$ einerseits (Juran et al., 2010) und CTLA-4-SNPs und einem HLA-Haplotyp andererseits (Einarsdottir et al., 2003).

Die vorliegende Arbeit ist in erster Linie eine epidemiologische Untersuchung an einer klinisch gut charakterisierten Studienkohorte von DCM-Patienten, die nach der Genotypverteilung von zwei CTLA-4-SNPs in Erkrankten und zum Vergleich klinisch gesunden Kontrollen fragt. Einschränkend muss erwähnt werden, dass uns leider keine Daten über den ethnischen Hintergrund der gesunden Blutspender vorliegen. Da sich zwischen kaukasischen und nicht-kaukasischen Populationen die Verteilungen der CTLA-4-CT60- (Kavvoura et al., 2007) und +49-Genotypen (Marron et al., 1997) jedoch gravierend unterscheiden, könnte dies einen ernstzunehmenden Bias zur Folge haben. Da die in dieser Arbeit erhobenen Daten jedoch ähnlich der in anderen Studien mit gleichem ethnischen Hintergrund ermittelten (van Belzen et al., 2004, Torres et al., 2004) sind und sich von nicht-kaukasischen Verteilungen (Weng et al., 2005, Kawasaki et al., 2008) unterscheiden und außerdem der Anteil der nicht-europäischen Immigranten in der Umgebung von Marburg niedrig ist, sollte von einer systematischen Verfälschung der Ergebnisse wohl eher nicht auszugehen sein.

Fernerhin wurden in dieser Arbeit pathogenetisch bedeutsame Zusammenhänge zwischen den verschiedenen CTLA-4-Genotypen und der Symptomatologie und dem Verlauf der DCM untersucht. Hier sind zwar Zusammenhänge zwischen dem CTLA-4-+49-GG-Genotyp und einigen gemessenen Parametern zu verzeichnen, diese erreichten jedoch keine Signifikanz. So war die beim Einschluss und Follow-Up mittels Echokardiographie gemessene Ejektionsfraktion (EF) von DCM-Patienten mit dem CTLA-4-CT42-GG-Genotyp im Durchschnitt etwas niedriger als die EF der Patienten mit dem AA-Genotyp. Der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDD) beim Follow-Up war durchschnittlich bei CTLA-4-+49-GG-Patienten etwas größer. Beides sind Hinweise darauf, dass die klinische Symptomatologie bei Patienten mit dem

CT42-AA-Genotyp vielleicht etwas milder verlaufen könnte als beim GG-Genotyp, doch erreichten beide Ergebnisse mittels ANOVA- und Tukey-Test keine Signifikanz und sind deswegen zu vernachlässigen. Dass ein Polymorphismus zwar eine Assoziation zur DCM zeigt, aber nicht zu ihrer Klinik bzw. ihrem Verlauf, ist nicht ungewöhnlich. Brooksbank et al. berichteten von ähnlichen Resultaten mit dem G-308A-Polymorphismus des Tumor-Nekrose-Faktors- α und seinem Zusammenhang zur DCM (Brooksbank et al., 2008). In der bisher einzigen anderen Studie, die eine Assoziation zwischen dem CTLA-4-+49-SNP und der DCM untersuchte, fand keine Analyse der Symptomatik oder des Verlaufes der DCM bezogen auf die +49-Genotypen statt (Liu et al., 2005). In Bezug auf den CTLA-4-CT60-Polymorphismus wurden in der hier vorgestellten klinischen Studie keine Zusammenhänge zwischen der Genotypverteilung und der klinischen Verlauf der DCM aufgedeckt. Möglicherweise ist das Follow-Up-Intervall von etwa einem Jahr zu kurz bemessen, um hier Einflüsse der beiden untersuchten CTLA-4-Polymorphismen auf die Entwicklung einer DCM aufzudecken.

Auch wenn der genaue Mechanismus, durch den CTLA-4 eine Hemmung der T-Zell-Antwort bewirkt, noch nicht vollständig aufgeklärt ist, steht wohl außer Frage, dass CTLA-4 solch eine Inhibition hervorruft. Genauso gesichert ist, dass eine Blockade von CTLA-4 umgekehrt die T-Zell-Aktivität fördert (Walunas et al., 1994, Krummel & Allison, 1995, Krummel & Allison, 1996). Aus dieser Beobachtung heraus wurden weitere Versuche unternommen, die Eigenschaften von CTLA-4, gegebenenfalls auch in Form einer Blockade, therapeutisch zu nutzen. Als Haupteinsatzgebiete sind hier auf der einen Seite Tumorerkrankungen, auf der anderen Seite Autoimmunerkrankungen und Transplantatabstoßungen zu nennen. Diese Therapieansätze beruhen auf der Hypothese, dass durch die Manipulation von CTLA-4 die Immunantwort entweder reduziert werden kann, um Autoimmunreaktionen und Transplantatabstoßungen zu verringern, oder auf der anderen Seite verstärkt werden kann, um die körpereigene Tumorbekämpfung zu verbessern (Tivol et al., 1996). Anders ausgedrückt wird durch die Beeinflussung von CTLA-4 versucht, entweder die periphere Toleranz zu stärken, um autoreaktive Vorgänge zu vermindern, oder sie zu schwächen, um eine Immunantwort gegen körpereigenes Gewebe bzw. Tumorgewebe zu fördern. Zum Einsatz kommen hier folglich die blockierenden CTLA-4-Antikörper in der Tumorthherapie (Anti-CTLA-4-AK) und die CTLA-4-Aktivität-fördernden-Antikörper (CTLA-4-AK oder -Ig) in der Therapie von Autoimmunerkrankungen (Wang et al., 2002b). Der Einsatz der Immuntherapie in der Behandlung von Tumoren ist grundsätzlich auf zwei Weisen denkbar: erstens die Förderung des aktivierend auf die Immunantwort wirkenden CD28 oder zweitens die Blockade seines inhibitorisch wirkenden Gegenspielers CTLA-4. Beide Mechanismen würden letztlich einen positiven Effekt auf die Tumorbekämpfung

haben.

Neben der Abwehr von Infektionen, die den Körper von außen angreifen, ist das Immunsystem auch befähigt, körpereigene Zellen, die maligne entartet sind, zu erkennen und zu bekämpfen. Dies ist möglich, da die meisten malignen Tumore Selbstantigene oder veränderte Selbstantigene auf ihrer Oberfläche besitzen, die entweder unter- oder überexprimiert sind (Sakaguchi, 2004, Peggs *et al.*, 2006). Obwohl T-Zellen die entarteten Zellen einiger Tumore folglich erkennen können, gehen die T-Zellen meist in einen anergen Zustand über, da den entarteten Zellen die kostimulatorischen Rezeptoren für CD28 fehlen, v.a. B7, die eine normale Körperzelle, im Gegensatz zu einer APC, nicht besitzt (Leach *et al.*, 1996). In Mausversuchen wurde bereits eine effektive Tumorbekämpfung erreicht, indem die Tumorzellen *ex vivo* mit B7-Molekülen bestückt wurden, anschließend wieder in die Maus eingebracht wurden und so eine T-Zell-Antwort hervorriefen. Die B7-positiven-Tumorzellen fungierten sozusagen als APCs für die T-Zellen. Diese richteten sich anschließend ebenfalls gegen die nicht-transfizierten Tumorzellen (Townsend *et al.*, 1994, Chen *et al.*, 1992). *In vitro* gelang dieses Verfahren auch mit menschlichen Tumorzellen, allerdings nur im Falle des malignen Melanoms. Bei anderen mit B7-transfizierten Tumorzellen kam es nicht zu einer erfolgreichen Tumorbekämpfung. Eine Erklärung hierfür wäre, dass, wie bereits oben erwähnt, nicht alle Tumore Selbstantigene auf ihrer Oberfläche tragen, die von T-Zellen erkannt werden (Antonia, 1999).

Aufgrund der negativ immunregulatorischen Eigenschaften von CTLA-4 ist es vorstellbar, dass eine Blockade der CTLA-4/B7-Interaktion die T-Zell-Aktivität gegen Tumorzellen steigert und so zu einer besseren Tumorbekämpfung führt (Leach *et al.*, 1996). Peggs *et al.* testeten in einem Mausmodell des malignen Melanoms, auf welche Weise der Anti-CTLA-4-Antikörper seine Wirkung entfaltet, ob durch eine Hemmung der Tregs oder eine verringerte Inhibierung der T-Effektor-Zellen. Die Autoren gelangten zu dem Schluss, dass beide Mechanismen eine Rolle spielen und unterstützen damit die Annahme, dass die CTLA-4-Funktion sowohl über Tregs als auch T-Effektor-Zellen gewährleistet wird (Peggs *et al.*, 2009). Anti-CTLA-4-AK führt somit potentiell auf zwei Wegen zu einer Förderung der Antitumoraktivität der T-Zellen (Ribas *et al.*, 2007).

An Fibrosarkomen oder Ovarialkarzinomen erkrankte Mäuse wurden von Yang *et al.* mit Anti-CTLA-4-AK behandelt und auf ihren Tumorprogress hin untersucht. Bei Mäusen in frühen Tumorstadien kam es zu einer Tumorregression, wohingegen Mäuse, die sich in einem späten Tumorstadium befanden, nicht von der CTLA-4-Blockade profitierten (Yang *et al.*, 1997). In Mausversuchen wurde die Anti-CTLA-4-AK-Therapie mit Tumoren getestet, die B7 nicht exprimierten. Auch in diesem Fall gelang eine effektive Tumorbekämpfung (Leach *et al.*, 1996). Kwon und Mitarbeiter demonstrierten eine

erfolgreiche Tumorbekämpfung in Mäusen mit Prostatakarzinom (Kwon *et al.*, 1997). Da ein positiver Effekt auf die Tumorbekämpfung nur dann zu entstehen scheint, wenn der Tumor immunogen ist, wurde versucht, die CTLA-4-Blockade mit anderen Therapien zu kombinieren. Hier sind die zusätzliche Gabe von mit GM-CSF (engl: granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor) transfizierten Tumorzellen (van Elsas *et al.*, 1999, Hurwitz *et al.*, 1998), ergänzende Strahlentherapie (Demaria *et al.*, 2005) oder eine zusätzliche niedrig dosierte Chemotherapie (Mokyr *et al.*, 1998) zu nennen.

Nach diesen vielversprechenden Erkenntnissen, die durch Tierversuche gewonnen wurden, begann man Studien über den Einsatz von Anti-CTLA-4-Antikörpern in der Tumorthherapie beim Menschen. Anti-CTLA-4-AK, z.B. Ipilimumab oder Tremelimumab, wurden vor allem in der Therapie des metastasierten Melanoms (O'Day *et al.*, 2007, Camacho *et al.*, 2009) und Nierenzellkarzinoms (Blansfield *et al.*, 2005) eingesetzt, aber auch zur Therapie des Pankreaskarzinoms (Royal *et al.*, 2010). Die objektiven Tumoransprechraten lagen bisher bei 7-15% bei vortherapierten Patienten mit metastasierten Tumoren (Peggs *et al.*, 2006). Hervorgerufen wurden diese Tumorantworten durch die Infiltration von zytotoxischen T-Lymphozyten (Ribas, 2010), die durch die Blockierung von CTLA-4 vermehrt proliferieren konnten. Leider entwickelten die mit CTLA-4-blockierenden-Antikörpern therapierten Tumorpatienten gehäuft autoimmune Erscheinungen, da die Blockade von CTLA-4 nicht spezifisch die periphere Toleranz für den zu behandelnden Tumor, sondern auch die allgemeine Toleranz gegen endogene Antigene senkt (Ribas, 2010). Die autoimmunen Reaktionen umfassen vor allem Dermatitis, Enterokolitis, Hepatitis, Uveitis und Hypophysitis (Beck *et al.*, 2006, Blansfield *et al.*, 2005).

Der Einfluss von CTLA-4-Polymorphismen, wie sie auch in dieser Arbeit untersucht wurden, wurde auch im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen analysiert. Pérez-García *et al.* konnten zeigen, dass der CTLA-4-CT60-Genotyp Einfluss auf den Verlauf der akuten myeloischen Leukämie hat. Patienten, die den CT60-AA-Genotyp besaßen, litten häufiger an Rückfällen und zeigten ein geringeres 3-Jahres-Überleben als Patienten mit dem CT60-GG-Genotyp. Der CT60-GG-Genotyp zeigte sich in diversen Studien prädisponierend für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen und der AA-Genotyp im Gegenzug protektiv. Daraus könnte man die Folgerung ziehen, dass CT60-AA fördernd auf die Funktion von CTLA-4, eventuell durch eine erhöhte Expression des sCTLA-4, und folglich hemmend auf eine Immunantwort wirkt. Anders ausgedrückt könnte der „tolerogene“ CT60-AA-Genotyp bewirken, dass ein maligner Tumor dem Immunsystem entgeht (Pérez-García *et al.*, 2009). Damit übereinstimmend berichteten Cozar *et al.* von einer signifikanten Häufung des CTLA-4-CT60-AA-Geno-

typs bei Patienten mit Nierenzellkarzinom im Vergleich zu einer Kontrollkohorte (Cozar *et al.*, 2007).

Neben dem Einsatz in der Tumorthherapie ist auch die Behandlung von Autoimmunerkrankungen ein mögliches Ziel von CTLA-4-modulierenden Antikörpern. Die Klinik von Autoimmunerkrankungen ist häufig durch Abfolgen von Krankheits-schüben und Remissionen gekennzeichnet. Wie es dazu kommt ist nicht vollständig geklärt, aber für die Remissionen der Multiplen Sklerose könnte unter anderem CTLA-4 eine Rolle spielen. Anlass zu dieser Vermutung waren von Karandikar *et al.* durchgeführte Versuche mit Mäusen, die an muriner Relapsing-remitting experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (R-EAE) litten, eine schubweise verlaufende experimentelle Krankheit, die der Multiplen Sklerose beim Menschen ähnelt. Ohne die genaue Wirkungsweise zu verstehen, fiel den Autoren auf, dass die Gabe von blockierenden CTLA-4-Antikörpern die Symptomatik der R-EAE verstärkte (Karandikar *et al.*, 1996). Eagar *et al.* berichteten, dass Mäuse nach der Gabe von blockierendem Anti-CTLA-4-AK, trotz vorheriger Toleranzinduzierung, eine R-EAE entwickelten (Eagar *et al.*, 2002). Bei nichtadipösen, diabetischen Mäusen (engl.: nonobese diabetic mice, NOD) konnte nach einer frühzeitigen Therapie mit CTLA-4-Ig erreicht werden, dass nur 11% der Mäuse Diabetes entwickelten, im Gegensatz zu 87% bei den Kontrollen (Lenschow *et al.*, 1995). Auch in einem Lupus-erythematoses-Mausmodell gelang es, das Leben der Mäuse durch die Gabe von CTLA-4-Ig zu verlängern (Finck *et al.*, 1994). Für die vorliegende Arbeit interessante Versuche führten Matsui *et al.* am Mausmodell der autoimmunen Myokarditis (engl.: experimental autoimmune myocarditis, EAM) durch. Bei frühzeitiger Gabe verhinderten CTLA-4-AK die Entstehung der EAM und bei später Gabe kam es noch immer zu einer verminderten Ausprägung der EAM (Matsui *et al.*, 2002).

Die vielversprechenden Experimente an murinen Autoimmunerkrankungen führten zum Einsatz von CTLA-4-Antikörpern beim Menschen. CTLA-4-AK, oder CTLA-4-Ig, ist eine rekombinante lösliche Form von CTLA-4, bestehend aus der schweren Kette des humanen IgG und der extrazellulären Domäne von CTLA-4 (Ruderman & Pope, 2005). CTLA-4-Ig wurde unter dem Namen Abatacept bereits in verschiedenen Studien zur Therapie von rheumatoider Arthritis (RA) im Sinne eines Immunmodulators getestet und zeigte sich ohne (Kremer, *et al.* 2011, Moreland, *et al.* 2002) und mit zusätzlicher Gabe von Methotrexat (Moreland *et al.*, 2002, Kremer *et al.*, 2003, Kremer *et al.*, 2011, Westhovens *et al.*, 2009) als effektives Therapeutikum der rheumatoiden Arthritis. Man nimmt an, dass der Wirkmechanismus von Abatacept auf der Wirkung von CTLA-4 basiert: Indem Abatacept an die B7-Rezeptoren bindet, fehlt der autoreaktiven T-Zelle das kostimulatorische Signal von CD28, um nach der Antigenpräsentation einer APC

zu proliferieren. Autoimmune Mechanismen werden in ihrem Entstehen oder Fortschreiten gehemmt (siehe Abbildung 45).

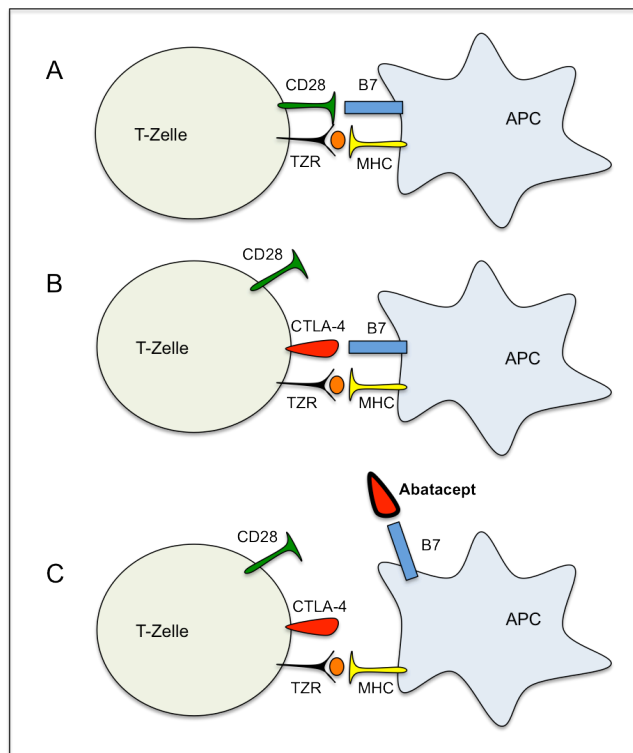


Abb. 45: Inhibition der T-Zell-Kostimulation durch den CTLA-4-Antikörper Abatacept. **A:** Für die T-Zell-Proliferation sind die T-Zell-Rezeptor(TZR)-MHC(Major Histocompatibility-Complex)-Interaktion und das kostimulatorische Signal über CD28 und B7 notwendig. **B:** CTLA-4 mindert als negativ wirkender Kostimulator die Bindung von CD28 an B7 und hemmt so die T-Zell-Proliferation. **C:** Der CTLA-4-AK Abatacept bindet an B7 und verhindert auf diese Weise eine Interaktion zwischen B7 mit CD28 oder CTLA-4. Es resultiert eine reduzierte T-Zell-Proliferation und in der Folge eine Hemmung von autoimmunen Vorgängen. (APC: Antigen-präsentierende Zelle, modifiziert nach (Ruderman & Pope, 2006))

Die Behandlung von systemischem Lupus erythematodes mit Abatacept erbrachte, im Gegensatz zum Einsatz bei Patienten mit rheumatoider Arthritis, in einer Studie von Merrill et al. nur eine geringe Wirksamkeit nach 12 Monaten, bei erhöhten Nebenwirkungen, im Vergleich zu mit Placebo behandelten Patienten (Merrill et al., 2010). Versuche von Álvarez-Quiroga und Kollegen mit RA-Patienten ergaben eine gesteigerte Treg-Funktion bei Patienten, die mit Abatacept therapiert wurden (Álvarez-Quiroga et al., 2011). Abatacept könnte seine positive Wirkung auf die RA-Symptomatik folglich über eine gesteigerte Treg-Aktivität ausüben. Diese Hypothese wäre im Einklang mit der Annahme, dass CTLA-4 die Funktion von Tregs moduliert.

Die einerseits vielversprechende Therapie mit CTLA-4-Antikörpern von Patienten mit der Autoimmunerkrankung rheumatoide Arthritis und der andererseits erfolgreiche

Einsatz von CTLA-4-AK bei an Myokarditis leidenden Mäusen (Matsui et al., 2002), legt die Vermutung nahe, dass vielleicht einige ausgewählte DCM-Patienten von einer Behandlung mit einem die CTLA-4-Funktion fördernden Antikörper profitieren würden. Die dadurch verbesserte Kontrolle von Autoimmunreaktionen könnte die Progression der autoimmunen Myokarditis zur DCM mindern (Tang et al., 2010). Diese Vermutung macht jedoch nur Sinn, wenn CTLA-4 und damit eine autoimmune Pathogenese in der DCM eine Rolle spielt. Die in dieser Arbeit demonstrierte Assoziation eines CTLA-4-Polymorphismus mit der DCM unterstützt diese Hypothese.

5. Zusammenfassung

Infektionen mit kardiotropen Viren sind oft begleitet von anhaltenden Autoimmunreaktionen im Myokardgewebe und führen gelegentlich zum Übergang einer chronischen Myokarditis zur dilatativen Kardiomyopathie (DCM), einer Herzerkrankung charakterisiert durch vergrößerte Ventrikel und eine reduzierte systolische Funktion. Das cytotoxische T-Lymphozyten-Antigen-4 (CTLA-4) ist ein inhibitorischer, auf der Oberfläche von aktivierten T-Zellen exprimierter Rezeptor, welcher mit kostimulatorischem CD28 um die Bindung an B7-Rezeptoren auf Antigen-präsentierenden Zellen kompetiert. Das Ziel der vorliegenden epidemiologischen Studie war es zu untersuchen, ob Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) im CTLA-4-Gen mit der Diagnose und dem klinischen Verlauf der DCM assoziiert sind. Insgesamt wurden 152 Patienten mit DCM und als Kontrollkollektiv 221 gesunde Blutspender auf die Präsenz des bekannten +49-(CT42)-Polymorphismus im CTLA-4-Gene mittels denaturierender Gradientengelelektrophorese (DGGE) getestet. Hierbei ergab sich, dass der G/G-Genotyp des CT42-Polymorphismus signifikant häufiger bei DCM-Patienten auftrat als bei den Kontrollen (24 von 152 Patienten (16%) versus 16 von 221 Kontrollen (7%), $p=0.029$). In der Nachbeobachtung ein Jahr nach Studieneinschluss hatten sich die linksventrikuläre Ejektionsfraktion und der enddiastolische Durchmesser des linken Ventrikels generell verbessert, doch war kein Unterschied zwischen den DCM-Patienten mit dem G/G-Genotyp und den anderen Genotypen zu verzeichnen. Im Gegensatz zum CT42-SNP fand sich keine statistisch signifikante Assoziation zwischen dem CT60-Polymorphismus in der 3'-untranslatierten Region in Exon 4 des CTLA-4-Gens und der Diagnose einer DCM. Zusammenfassend belegen diese Daten, dass der CTLA-4-Polymorphismus CT42 auf eine erhöhte Prädisposition für die Entstehung einer DCM verweist, aber den Verlauf der Erkrankung im ersten Jahr nach Diagnosestellung wohl nicht zu beeinflussen vermag. Der G/G-Genotyp kodiert für eine Thr17Ala-Variante in der amino-terminalen Signalpeptid-Sequenz des CTLA-4-Moleküls. Die Substitution eines singulären Aminosäurerestes von Threonin nach Alanin in dieser Position könnte mit dysregulierten Autoimmunreaktionen gegen Myokardgewebe verbunden sein, die mit fortschreitender Zerstörung von kardialen Myozyten und der Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie assoziiert sind.

6. Abstract

Infections with cardiotropic viruses are often accompanied by ongoing autoimmune reactions in the myocardium and occasionally result in the transition from chronic myocarditis to dilated cardiomyopathy (DCM), a heart disease characterized by enlarged ventricles and reduced systolic function. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) is an inhibitory receptor expressed on the surface of activated T cells, which competes with co-stimulatory CD28 for binding to B7 receptors on antigen-presenting cells. The aim of this epidemiological study was to assess whether single nucleotide polymorphisms (SNPs) within the CTLA-4 gene are associated with the diagnosis and disease course of DCM. A total of 152 DCM patients and 221 healthy blood donors used as controls were tested for the presence of the known +49-(CT42) polymorphism in the CTLA-4 gene by means of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). It was found that the G/G genotype of the CT42 polymorphism was significantly more frequent in DCM patients as compared to controls (24 out of 152 patients (16%) versus 16 out of 221 controls (7%), $p=0.029$). At follow-up one year after study inclusion, the left-ventricular ejection fraction and the end-diastolic diameter of the left ventricle had generally improved, however, there was no difference between DCM patients carrying the CT42 G/G genotype versus other genotypes ($n=199$). In contrast to the CT42 SNP, no statistically significant association was found between the CT60 polymorphism in the 3'-untranslated region in exon 4 of the CTLA-4 gene and the diagnosis of DCM. In summary, these data indicate that the common CTLA-4 polymorphism CT42 confers susceptibility for DCM, but appears not to influence the course of the disease one year after diagnosis. The G/G genotype encodes for a Thr17Ala variant in the amino-terminally signal leader peptide of the CTLA-4 molecule, suggesting that a single amino-acid exchange from threonine to alanine at this position may be associated with unbalanced autoimmune reactions against myocardial tissue which ultimately leads to progressive destruction of cardiac myocytes and the development of dilated cardiomyopathy.

7. Literaturverzeichnis

Ahmed, S., K. Ihara, S. Kanemitsu, H. Nakashima, T. Otsuka, K. Tsuzaka, T. Takeuchi & T. Hara, (2001) Association of CTLA-4 but not CD28 gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in the Japanese population. *Rheumatology (Oxford)* **40**: 662-667.

Anaya, J. M., L. Gómez & J. Castiblanco, (2006) Is there a common genetic basis for autoimmune diseases? *Clin Dev Immunol* **13**: 185-195.

Anderson, D. E., A. H. Sharpe & D. A. Hafler, (1999) The B7-CD28/CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmune disease of the central nervous system. *Curr Opin Immunol* **11**: 677-683.

Anjos, S., A. Nguyen, H. Ounissi-Benkalha, M. C. Tessier & C. Polychronakos, (2002) A common autoimmunity predisposing signal peptide variant of the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 results in inefficient glycosylation of the susceptibility allele. *J Biol Chem* **277**: 46478-46486.

Anjos, S. M., W. Shao, L. Marchand & C. Polychronakos, (2005) Allelic effects on gene regulation at the autoimmunity-predisposing CTLA4 locus: a re-evaluation of the 3' +6230G>A polymorphism. *Genes Immun* **6**: 305-311.

Anjos, S. M., M. C. Tessier & C. Polychronakos, (2004) Association of the cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 gene with type 1 diabetes: evidence for independent effects of two polymorphisms on the same haplotype block. *J Clin Endocrinol Metab* **89**: 6257-6265.

- Antonia, S. J., (1999) B7-1 gene-modified tumor cell vaccines. *Curr Opin Mol Ther* **1**: 50-56.
- Atabani, S. F., C. L. Thio, S. Divanovic, A. Trompette, Y. Belkaid, D. L. Thomas & C. L. Karp, (2005) Association of CTLA4 polymorphism with regulatory T cell frequency. *Eur J Immunol* **35**: 2157-2162.
- Barreto, M., R. C. Ferreira, L. Lourenço, M. F. Moraes-Fontes, E. Santos, M. Alves, C. Carvalho, B. Martins, R. Andreia, J. F. Viana, C. Vasconcelos, L. Mota-Vieira, C. Ferreira, J. Demengeot & A. M. Vicente, (2009) Low frequency of CD4+CD25+ Treg in SLE patients: a heritable trait associated with CTLA4 and TGFbeta gene variants. *BMC Immunol* **10**: 5.
- Barreto, M., E. Santos, R. Ferreira, C. Fesel, M. F. Fontes, C. Pereira, B. Martins, R. Andreia, J. F. Viana, F. Crespo, C. Vasconcelos, C. Ferreira & A. M. Vicente, (2004) Evidence for CTLA4 as a susceptibility gene for systemic lupus erythematosus. *Eur J Hum Genet* **12**: 620-626.
- Beck, K. E., J. A. Blansfield, K. Q. Tran, A. L. Feldman, M. S. Hughes, R. E. Royal, U. S. Kammula, S. L. Topalian, R. M. Sherry, D. Kleiner, M. Quezado, I. Lowy, M. Yellin, S. A. Rosenberg & J. C. Yang, (2006) Enterocolitis in patients with cancer after antibody blockade of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4. *J Clin Oncol* **24**: 2283-2289.
- Berry, A., M. Tector & M. K. Oaks, (2008) Lack of association between sCTLA-4 levels in human plasma and common CTLA-4 polymorphisms. *J Negat Results Biomed* **7**: 8.
- Blansfield, J. A., K. E. Beck, K. Tran, J. C. Yang, M. S. Hughes, U. S. Kammula, R. E. Royal, S. L. Topalian, L. R. Haworth, C. Levy, S. A. Rosenberg & R. M. Sherry, (2005) Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 blockage can induce autoimmune hypophysitis in patients with metastatic melanoma and renal cancer. *J Immunother* **28**: 593-598.

- Blomhoff, A., B. A. Lie, A. G. Myhre, E. H. Kemp, A. P. Weetman, H. E. Akselsen, E. S. Huseby & D. E. Undlien, (2004) Polymorphisms in the cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene region confer susceptibility to Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* **89**: 3474-3476.
- Bluestone, J. A., (1997) Is CTLA-4 a master switch for peripheral T cell tolerance? *J Immunol* **158**: 1989-1993.
- Braun, J., H. Donner, T. Siegmund, P. G. Walfish, K. H. Usadel & K. Badenhoop, (1998) CTLA-4 promoter variants in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *Tissue Antigens* **51**: 563-566.
- Brooksbank, R., D. Badenhorst, K. Sliwa, G. Norton & A. Woodiwiss, (2008) The G-308A polymorphism of the TNF-alpha gene does not predict changes in cardiac function in response to medical therapy for idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc J Afr* **19**: 254-258.
- Brophy, K., A. W. Ryan, J. M. Thornton, M. Abuzakouk, A. P. Fitzgerald, R. M. McLoughlin, C. O'morain, N. P. Kennedy, F. M. Stevens, C. Feighery, D. Kelleher & R. McManus, (2006) Haplotypes in the CTLA4 region are associated with coeliac disease in the Irish population. *Genes Immun* **7**: 19-26.
- Brozzetti, A., S. Marzotti, C. Tortoioli, V. Bini, R. Giordano, F. Dotta, C. Betterle, A. De Bellis, G. Arnaldi, V. Toscano, E. Arvat, A. Bellastella, F. Mantero, A. Falorni & I. A. Network, (2010) Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 Ala17 polymorphism is a genetic marker of autoimmune adrenal insufficiency: Italian association study and meta-analysis of European studies. *Eur J Endocrinol* **162**: 361-369.
- Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paeper, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler & F. Ramsdell, (2001) Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* **27**: 68-73.

- Butty, V., M. Roy, P. Sabeti, W. Besse, C. Benoist & D. Mathis, (2007) Signatures of strong population differentiation shape extended haplotypes across the human CD28, CTLA4, and ICOS costimulatory genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 570-575.
- Caforio, A. L., L. Daliento, A. Angelini, S. Bottaro, A. Vinci, G. Dequal, F. Tona, S. Iliceto, G. Thiene & W. J. McKenna, (2005) Autoimmune myocarditis and dilated cardiomyopathy: focus on cardiac autoantibodies. *Lupus* **14**: 652-655.
- Caforio, A. L., N. G. Mahon, M. K. Baig, F. Tona, R. T. Murphy, P. M. Elliott & W. J. McKenna, (2007) Prospective familial assessment in dilated cardiomyopathy: cardiac autoantibodies predict disease development in asymptomatic relatives. *Circulation* **115**: 76-83.
- Camacho, L. H., S. Antonia, J. Sosman, J. M. Kirkwood, T. F. Gajewski, B. Redman, D. Pavlov, C. Bulanhagui, V. A. Bozon, J. Gomez-Navarro & A. Ribas, (2009) Phase I/II trial of tremelimumab in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* **27**: 1075-1081.
- Carniel, E., M. R. Taylor, G. Sinagra, A. Di Lenarda, L. Ku, P. R. Fain, M. M. Boucek, J. Cavanaugh, S. Miocic, D. Slavov, S. L. Graw, J. Feiger, X. Z. Zhu, D. Dao, D. A. Ferguson, M. R. Bristow & L. Mestroni, (2005) Alpha-myosin heavy chain: a sarcomeric gene associated with dilated and hypertrophic phenotypes of cardiomyopathy. *Circulation* **112**: 54-59.
- Chambers, C. A., T. J. Sullivan & J. P. Allison, (1997) Lymphoproliferation in CTLA-4-deficient mice is mediated by costimulation-dependent activation of CD4+ T cells. *Immunity* **7**: 885-895.
- Chen, L., S. Ashe, W. A. Brady, I. Hellström, K. E. Hellström, J. A. Ledbetter, P. McGowan & P. S. Linsley, (1992) Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell* **71**: 1093-1102.

- Chen, Q. Y., D. Nadell, X. Y. Zhang, A. Kukreja, Y. J. Huang, J. Wise, F. Svec, R. Richards, K. E. Friday, A. Vargas, R. Gomez, S. Chalew, M. S. Lan, Y. Tomer & N. K. Maclaren, (2000) The human leukocyte antigen HLA DRB3*020/DQA1*0501 haplotype is associated with Graves' disease in African Americans. *J Clin Endocrinol Metab* **85**: 1545-1549.
- Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady & S. M. Wahl, (2003) Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* **198**: 1875-1886.
- Chen, Z., F. Zhou, S. Huang, T. Jiang, L. Chen, L. Ge & B. Xia, (2011) Association of cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 gene (rs60872763) polymorphism with Crohn's disease and high levels of serum sCTLA-4 in Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* **26**: 924-930.
- Chistiakov, D. A., K. V. Savost'anov & V. V. Nosikov, (2001) CTLA4 gene polymorphisms are associated with, and linked to, insulin-dependent diabetes mellitus in a Russian population. *BMC Genet* **2**: 6.
- Chistiakov, D. A. & R. I. Turakulov, (2003) CTLA-4 and its role in autoimmune thyroid disease. *J Mol Endocrinol* **31**: 21-36.
- Cozar, J. M., J. M. Romero, N. Aptsiauri, F. Vazquez, J. R. Vilchez, M. Tallada, F. Garrido & F. Ruiz-Cabello, (2007) High incidence of CTLA-4 AA (CT60) polymorphism in renal cell cancer. *Hum Immunol* **68**: 698-704.
- Crispin, J. C., A. Martínez & J. Alcocer-Varela, (2003) Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* **21**: 273-276.
- Cunninghame Graham, D. S., A. K. Wong, N. J. McHugh, J. C. Whittaker & T. J. Vyse, (2006) Evidence for unique association signals in SLE at the CD28-CTLA4-ICOS locus in a family-based study. *Hum Mol Genet* **15**: 3195-3205.

- Daha, N. A., F. A. Kurreeman, R. B. Marques, G. Stoeken-Rijsbergen, W. Verduijn, T. W. Huizinga & R. E. Toes, (2009) Confirmation of STAT4, IL2/IL21, and CTLA4 polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **60**: 1255-1260.
- Dallos, T., M. Avbelj, L. Barák, J. Zapletalová, Z. Pribilincová, M. Krajčírová, L. Kostálová, T. Battelino & L. Kovács, (2008) CTLA-4 gene polymorphisms predispose to autoimmune endocrinopathies but not to celiac disease. *Neuro Endocrinol Lett* **29**: 334-340.
- Demaria, S., N. Kawashima, A. M. Yang, M. L. Devitt, J. S. Babb, J. P. Allison & S. C. Formenti, (2005) Immune-mediated inhibition of metastases after treatment with local radiation and CTLA-4 blockade in a mouse model of breast cancer. *Clin Cancer Res* **11**: 728-734.
- Donaldson, P., S. Veeramani, A. Baragiotta, A. Floreani, C. Venturi, S. Pearce, V. Wilson, D. Jones, O. James, J. Taylor, J. Newton & M. Bassendine, (2007) Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 single nucleotide polymorphisms and haplotypes in primary biliary cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* **5**: 755-760.
- Donner, H., J. Braun, C. Seidl, H. Rau, R. Finke, M. Ventz, P. G. Walfish, K. H. Usadel & K. Badenhoop, (1997a) Codon 17 polymorphism of the cytotoxic T lymphocyte antigen 4 gene in Hashimoto's thyroiditis and Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* **82**: 4130-4132.
- Donner, H., H. Rau, P. G. Walfish, J. Braun, T. Siegmund, R. Finke, J. Herwig, K. H. Usadel & K. Badenhoop, (1997b) CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* **82**: 143-146.
- Eagar, T. N., N. J. Karandikar, J. A. Bluestone & S. D. Miller, (2002) The role of CTLA-4 in induction and maintenance of peripheral T cell tolerance. *Eur J Immunol* **32**: 972-981.

- Einarsdottir, E., I. Söderström, A. Löfgren-Burström, S. Haraldsson, S. Nilsson-Ardnor, C. Penha-Goncalves, L. Lind, G. Holmgren, M. Holmberg, K. Asplund & D. Holmberg, (2003) The CTLA4 region as a general autoimmunity factor: an extended pedigree provides evidence for synergy with the HLA locus in the etiology of type 1 diabetes mellitus, Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease. *Eur J Hum Genet* **11**: 81-84.
- Elliott, P., B. Andersson, E. Arbustini, Z. Bilinska, F. Cecchi, P. Charron, O. Dubourg, U. Kühl, B. Maisch, W. J. McKenna, L. Monserrat, S. Pankuweit, C. Rapezzi, P. Seferovic, L. Tavazzi & A. Keren, (2008) Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* **29**: 270-276.
- Felker, G. M., R. E. Thompson, J. M. Hare, R. H. Hruban, D. E. Cimetson, D. L. Howard, K. L. Baughman & E. K. Kasper, (2000) Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *N Engl J Med* **342**: 1077-1084.
- Fernández-Mestre, M., K. Sánchez, O. Balbás, K. Gendzekhzadze, V. Ogando, M. Cabrera & Z. Layrisse, (2009) Influence of CTLA-4 gene polymorphism in autoimmune and infectious diseases. *Hum Immunol* **70**: 532-535.
- Finck, B. K., P. S. Linsley & D. Wofsy, (1994) Treatment of murine lupus with CTLA4Ig. *Science* **265**: 1225-1227.
- Fischer, S. G. & L. S. Lerman, (1983) DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 1579-1583.
- Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, L. M. Williams, J. L. Dooley, A. G. Farr & A. Y. Rudensky, (2005) Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* **22**: 329-341.

- Fontenot, J. D. & A. Y. Rudensky, (2005) A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* **6**: 331-337.
- Fragoso, J. M., J. M. Rodríguez-Pérez, J. González, D. Cruz, O. Pérez-Méndez, J. de Jesus García, A. de la Peña, M. Arce, P. A. Reyes & G. Vargas-Alarcón, (2006) Beta1-adrenergic receptor gene polymorphisms in Mexican patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Exp Mol Pathol* **80**: 279-282.
- Friedline, R. H., D. S. Brown, H. Nguyen, H. Kornfeld, J. Lee, Y. Zhang, M. Appleby, S. D. Der, J. Kang & C. A. Chambers, (2009) CD4+ regulatory T cells require CTLA-4 for the maintenance of systemic tolerance. *J Exp Med* **206**: 421-434.
- Futamatsu, H., J. Suzuki, H. Kosuge, O. Yokoseki, M. Kamada, H. Ito, M. Inobe, M. Isobe & T. Uede, (2003) Attenuation of experimental autoimmune myocarditis by blocking activated T cells through inducible costimulatory molecule pathway. *Cardiovasc Res* **59**: 95-104.
- Gambineri, E., T. R. Torgerson & H. D. Ochs, (2003) Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol* **15**: 430-435.
- Gerold, K. D., P. Zheng, D. B. Rainbow, A. Zernecke, L. S. Wicker & S. Kissler, (2011) The soluble CTLA-4 splice variant protects from type 1 diabetes and potentiates regulatory T-cell function. *Diabetes* **60**: 1955-1963.
- Gough, S. C., L. S. Walker & D. M. Sansom, (2005) CTLA4 gene polymorphism and autoimmunity. *Immunol Rev* **204**: 102-115.
- Greenwald, R. J., V. A. Boussiotis, R. B. Liorbach, A. K. Abbas & A. H. Sharpe, (2001) CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity* **14**: 145-155.

- Gregersen, P. K. & T. W. Behrens, (2006) Genetics of autoimmune diseases-- disorders of immune homeostasis. *Nat Rev Genet* **7**: 917-928.
- Greve, B., R. Simonenko, Z. Illes, A. Peterfalvi, N. Hamdi, M. P. Mycko, K. W. Selmaj, C. Rozsa, K. Rajczy, P. Bauer, K. Berger & R. Weissert, (2008) Multiple sclerosis and the CTLA4 autoimmunity polymorphism CT60: no association in patients from Germany, Hungary and Poland. *Mult Scler* **14**: 153-158.
- Grünig, E., J. A. Tasman, H. Kücherer, W. Franz, W. Kübler & H. A. Katus, (1998) Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **31**: 186-194.
- Gudjónsdóttir, A. H., S. Nilsson, A. T. Naluai, J. Ek, S. S. Amundsen, J. Wahlström & H. Ascher, (2009) Association between genotypes and phenotypes in coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **49**: 165-169.
- Han, S., Y. Li, Y. Mao & Y. Xie, (2005) Meta-analysis of the association of CTLA-4 exon-1 +49A/G polymorphism with rheumatoid arthritis. *Hum Genet* **118**: 123-132.
- Han, S. Z., S. H. Zhang, R. Li, W. Y. Zhang & Y. Li, (2006) The common -318C/T polymorphism in the promoter region of CTLA4 gene is associated with reduced risk of ophthalmopathy in Chinese Graves' patients. *Int J Immunogenet* **33**: 281-287.
- Harper, K., C. Balzano, E. Rouvier, M. G. Mattei, M. F. Luciani & P. Golstein, (1991) CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *J Immunol* **147**: 1037-1044.
- Heggarty, S., V. Suppiah, J. Silversides, C. O'doherty, A. Droogan, G. McDonnell, S. Hawkins, C. Graham & K. Vandenbroeck, (2007) CTLA4 gene polymorphisms and multiple sclerosis in Northern Ireland. *J Neuroimmunol* **187**: 187-191.

- Heward, J., C. Gordon, A. Allahabadia, A. H. Barnett, J. A. Franklyn & S. C. Gough, (1999) The A-G polymorphism in exon 1 of the CTLA-4 gene is not associated with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* **58**: 193-195.
- Heward, J. M., A. Allahabadia, J. Carr-Smith, J. Daykin, C. S. Cockram, C. Gordon, A. H. Barnett, J. A. Franklyn & S. C. Gough, (1998) No evidence for allelic association of a human CTLA-4 promoter polymorphism with autoimmune thyroid disease in either population-based case-control or family-based studies. *Clin Endocrinol (Oxf)* **49**: 331-334.
- Huang, D., R. Giscombe, Y. Zhou, R. Pirskanen & A. K. Lefvert, (2000) Dinucleotide repeat expansion in the CTLA-4 gene leads to T cell hyper-reactivity via the CD28 pathway in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* **105**: 69-77.
- Hunt, K. A., D. P. McGovern, P. J. Kumar, S. Ghosh, S. P. Travis, J. R. Walters, D. P. Jewell, R. J. Playford & D. A. van Heel, (2005) A common CTLA4 haplotype associated with coeliac disease. *Eur J Hum Genet* **13**: 440-444.
- Hurwitz, A. A., T. F. Yu, D. R. Leach & J. P. Allison, (1998) CTLA-4 blockade synergizes with tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of an experimental mammary carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 10067-10071.
- Hutloff, A., A. M. Dittrich, K. C. Beier, B. Eljaschewitsch, R. Kraft, I. Anagnostopoulos & R. A. Kroczeck, (1999) ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* **397**: 263-266.
- John, K. K., F. F. Brockschmidt, S. Redler, C. Herold, S. Hanneken, S. Eigelshoven, K. A. Giehl, J. De Weert, G. Lutz, R. Kruse, H. Wolff, B. Blaumeiser, M. Böhm, T. Becker, M. M. Nöthen & R. C. Betz, (2011) Genetic variants in CTLA4 are strongly associated with alopecia areata. *J Invest Dermatol* **131**: 1169-1172.

- Johnson, G. C., L. Esposito, B. J. Barratt, A. N. Smith, J. Heward, G. Di Genova, H. Ueda, H. J. Cordell, I. A. Eaves, F. Dudbridge, R. C. Twells, F. Payne, W. Hughes, S. Nutland, H. Stevens, P. Carr, E. Tuomilehto-Wolf, J. Tuomilehto, S. C. Gough, D. G. Clayton & J. A. Todd, (2001) Haplotype tagging for the identification of common disease genes. *Nat Genet* **29**: 233-237.
- Joshita, S., T. Umemura, K. Yoshizawa, Y. Katsuyama, E. Tanaka, M. Nakamura, H. Ishibashi, M. Ota & S. P. S. Group, (2010) Association analysis of cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene polymorphisms with primary biliary cirrhosis in Japanese patients. *J Hepatol* **53**: 537-541.
- Juran, B. D., E. J. Atkinson, J. J. Larson, E. M. Schlicht, X. Liu, E. J. Heathcote, G. M. Hirschfield, K. A. Siminovitch & K. N. Lazaridis, (2010) Carriage of a tumor necrosis factor polymorphism amplifies the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 attributed risk of primary biliary cirrhosis: evidence for a gene-gene interaction. *Hepatology* **52**: 223-229.
- Juran, B. D., E. J. Atkinson, E. M. Schlicht, B. L. Fridley & K. N. Lazaridis, (2008) Primary biliary cirrhosis is associated with a genetic variant in the 3' flanking region of the CTLA4 gene. *Gastroenterology* **135**: 1200-1206.
- Kaartinen, T., J. Lappalainen, K. Haimila, M. Autero & J. Partanen, (2007) Genetic variation in ICOS regulates mRNA levels of ICOS and splicing isoforms of CTLA4. *Mol Immunol* **44**: 1644-1651.
- Kamesh, L., J. M. Heward, J. M. Williams, S. C. Gough, K. M. Chavele, A. Salama, C. Pusey, C. O. Savage & L. Harper, (2009) CT60 and +49 polymorphisms of CTLA 4 are associated with ANCA-positive small vessel vasculitis. *Rheumatology (Oxford)* **48**: 1502-1505.
- Karandikar, N. J., C. L. Vanderlugt, T. L. Walunas, S. D. Miller & J. A. Bluestone, (1996) CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease. *J Exp Med* **184**: 783-788.

- Kavvoura, F. K., T. Akamizu, T. Awata, Y. Ban, D. A. Chistiakov, I. Frydecka, A. Ghaderi, S. C. Gough, Y. Hiromatsu, R. Ploski, P. W. Wang, T. Bednarczuk, E. I. Chistiakova, M. Chojm, J. M. Heward, H. Hiratani, S. H. Juo, L. Karabon, S. Katayama, S. Kurihara, R. T. Liu, I. Miyake, G. H. Omrani, E. Pawlak, M. Taniyama, T. Tozaki & J. P. Ioannidis, (2007) Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 gene polymorphisms and autoimmune thyroid disease: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* **92**: 3162-3170.
- Kawasaki, E., A. Imagawa, H. Makino, M. Uga, N. Abiru, T. Hanafusa, Y. Uchigata & K. Eguchi, (2008) Differences in the contribution of the CTLA4 gene to susceptibility to fulminant and type 1A diabetes in Japanese patients. *Diabetes Care* **31**: 1608-1610.
- Khatlani, T. S., K. Ohno, Z. Ma, H. Inokuma & T. Onishi, (2000) Cloning and sequencing of dog cDNA encoding the T-cell costimulatory molecule (CTLA-4). *Immunogenetics* **51**: 79-81.
- King, A. L., S. J. Moodie, J. S. Fraser, D. Curtis, E. Reid, A. M. Dearlove & P. J. Ciclitira, (2003) Coeliac disease: investigation of proposed causal variants in the CTLA4 gene region. *Eur J Immunogenet* **30**: 427-432.
- Kishimoto, C., K. Kuribayashi, T. Masuda, N. Tomioka & C. Kawai, (1985) Immunologic behavior of lymphocytes in experimental viral myocarditis: significance of T lymphocytes in the severity of myocarditis and silent myocarditis in BALB/c-nu/nu mice. *Circulation* **71**: 1247-1254.
- Kolar, P., K. Knieke, J. K. Hegel, D. Quandt, G. R. Burmester, H. Hoff & M. C. Brunner-Weinzierl, (2009) CTLA-4 (CD152) controls homeostasis and suppressive capacity of regulatory T cells in mice. *Arthritis Rheum* **60**: 123-132.
- Komajda, M., J. P. Jais, F. Reeves, B. Goldfarb, J. B. Bouhour, Y. Juillieres, J. Lanfranchi, P. Peycelon, P. Geslin & D. Carrie, (1990) Factors predicting mortality in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* **11**: 824-831.

- Kouki, T., C. A. Gardine, T. Yanagawa & L. J. Degroot, (2002) Relation of three polymorphisms of the CTLA-4 gene in patients with Graves' disease. *J Endocrinol Invest* **25**: 208-213.
- Kouki, T., Y. Sawai, C. A. Gardine, M. E. Fisfalen, M. L. Alegre & L. J. DeGroot, (2000) CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease. *J Immunol* **165**: 6606-6611.
- Kremer, J. M., A. S. Russell, P. Emery, C. Abud-Mendoza, J. Szechinski, R. Westhovens, T. Li, X. Zhou, J. C. Becker, R. Aranda, C. Peterfy & H. K. Genant, (2011) Long-term safety, efficacy and inhibition of radiographic progression with abatacept treatment in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate: 3-year results from the AIM trial. *Ann Rheum Dis* **70**: 1826-1830.
- Kremer, J. M., R. Westhovens, M. Leon, E. Di Giorgio, R. Alten, S. Steinfeld, A. Russell, M. Dougados, P. Emery, I. F. Nuamah, G. R. Williams, J. C. Becker, D. T. Hagerty & L. W. Moreland, (2003) Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig. *N Engl J Med* **349**: 1907-1915.
- Kristiansen, O. P., Z. M. Larsen & F. Pociot, (2000) CTLA-4 in autoimmune diseases--a general susceptibility gene to autoimmunity? *Genes Immun* **1**: 170-184.
- Krummel, M. F. & J. P. Allison, (1995) CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* **182**: 459-465.
- Krummel, M. F. & J. P. Allison, (1996) CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med* **183**: 2533-2540.

- Kukreja, A., G. Cost, J. Marker, C. Zhang, Z. Sun, K. Lin-Su, S. Ten, M. Sanz, M. Exley, B. Wilson, S. Porcelli & N. Maclaren, (2002) Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest* **109**: 131-140.
- Kwon, E. D., A. A. Hurwitz, B. A. Foster, C. Madias, A. L. Feldhaus, N. M. Greenberg, M. B. Burg & J. P. Allison, (1997) Manipulation of T cell costimulatory and inhibitory signals for immunotherapy of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 8099-8103.
- Leach, D. R., M. F. Krummel & J. P. Allison, (1996) Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* **271**: 1734-1736.
- Lee, Y. H., Y. R. Kim, J. D. Ji, J. Sohn & G. G. Song, (2001) Polymorphisms of the CTLA-4 exon 1 and promoter gene in systemic lupus erythematosus. *Lupus* **10**: 601-605.
- Lenschow, D. J., S. C. Ho, H. Sattar, L. Rhee, G. Gray, N. Nabavi, K. C. Herold & J. A. Bluestone, (1995) Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *J Exp Med* **181**: 1145-1155.
- Lesage, S. & C. C. Goodnow, (2001) Organ-specific autoimmune disease: a deficiency of tolerogenic stimulation. *J Exp Med* **194**: F31-36.
- Li, J., L. Wang, S. Wang, H. Zhu, P. Ye, A. Xie, B. Shen, C. Liu, C. Guo, Q. Fu, K. Zhang & J. Xia, (2010) The Treg/Th17 imbalance in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Scand J Immunol* **71**: 298-303.
- Ligers, A., N. Teleshova, T. Masterman, W. X. Huang & J. Hillert, (2001) CTLA-4 gene expression is influenced by promoter and exon 1 polymorphisms. *Genes Immun* **2**: 145-152.

- Lin, A., W. H. Yan, H. H. Xu, L. J. Tang, X. F. Chen, M. Zhu & M. Y. Zhou, (2007) 14 bp deletion polymorphism in the HLA-G gene is a risk factor for idiopathic dilated cardiomyopathy in a Chinese Han population. *Tissue Antigens* **70**: 427-431.
- Linsley, P. S., W. Brady, M. Urnes, L. S. Grosmaire, N. K. Damle & J. A. Ledbetter, (1991) CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* **174**: 561-569.
- Linsley, P. S., J. L. Greene, P. Tan, J. Bradshaw, J. A. Ledbetter, C. Anasetti & N. K. Damle, (1992a) Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J Exp Med* **176**: 1595-1604.
- Linsley, P. S., P. M. Wallace, J. Johnson, M. G. Gibson, J. L. Greene, J. A. Ledbetter, C. Singh & M. A. Tepper, (1992b) Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science* **257**: 792-795.
- Liu, M. F., C. R. Wang, L. C. Lin & C. R. Wu, (2001) CTLA-4 gene polymorphism in promoter and exon-1 regions in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* **10**: 647-649.
- Liu, W., W. M. Li, C. Gao, X. R. Wang, D. M. Li & N. L. Sun, (2005) [Relationship of CTLA-4 exon 1 A49-->G polymorphism with sCTLA-4 and Th1/Th2 bias in idiopathic dilated cardiomyopathy]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **85**: 3221-3224.
- Liu, W., W. M. Li, S. S. Yang, C. Gao, S. J. Li, Y. Li, Y. H. Kong & R. T. Gan, (2006) Association of HLA class II DRB1, DPA1 and DPB1 polymorphism with genetic susceptibility to idiopathic dilated cardiomyopathy in Chinese Han nationality. *Autoimmunity* **39**: 461-467.

- Lorentzen, A. R., E. G. Celius, P. O. Ekstrøm, K. Wiencke, B. A. Lie, K. M. Myhr, V. Ling, E. Thorsby, F. Vartdal, A. Spurkland & H. F. Harbo, (2005) Lack of association with the CD28/CTLA4/ICOS gene region among Norwegian multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* **166**: 197-201.
- Lozano, M. D., R. J. Rubocki, J. E. Wilson, B. M. McManus & J. L. Wisecarver, (1997) Human leukocyte antigen class II associations in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. Myocarditis Treatment Trial Investigators. *J Card Fail* **3**: 97-103.
- Magistrelli, G., P. Jeannin, N. Herbault, A. Benoit De Coignac, J. F. Gauchat, J. Y. Bonnefoy & Y. Delneste, (1999) A soluble form of CTLA-4 generated by alternative splicing is expressed by nonstimulated human T cells. *Eur J Immunol* **29**: 3596-3602.
- Magyari, L., B. Faragó, J. Bene, K. Horvatovich, L. Lakner, M. Varga, M. Figler, B. Gasztanyi, G. Mózsik & B. Melegh, (2007) No association of the cytotoxic T-lymphocyte associated gene CTLA4 +49A/G polymorphisms with Crohn's disease and ulcerative colitis in Hungarian population samples. *World J Gastroenterol* **13**: 2205-2208.
- Maisch, B., E. Bauer, M. Cirsì & K. Kochsiek, (1993) Cytolytic cross-reactive antibodies directed against the cardiac membrane and viral proteins in coxsackievirus B3 and B4 myocarditis. Characterization and pathogenetic relevance. *Circulation* **87**: IV49-65.
- Maisch, B., A. Richter, A. Sandmöller, I. Portig, S. Pankuweit & B.-H. F. Network, (2005) Inflammatory dilated cardiomyopathy (DCMI). *Herz* **30**: 535-544.

- Marron, M. P., L. J. Raffel, H. J. Garchon, C. O. Jacob, M. Serrano-Rios, M. T. Martinez Larrad, W. P. Teng, Y. Park, Z. X. Zhang, D. R. Goldstein, Y. W. Tao, G. Beaurain, J. F. Bach, H. S. Huang, D. F. Luo, A. Zeidler, J. I. Rotter, M. C. Yang, T. Modilevsky, N. K. Maclaren & J. X. She, (1997) Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is associated with CTLA4 polymorphisms in multiple ethnic groups. *Hum Mol Genet* **6**: 1275-1282.
- Mason, J. W., (2003) Myocarditis and dilated cardiomyopathy: an inflammatory link. *Cardiovasc Res* **60**: 5-10.
- Masteller, E. L., E. Chuang, A. C. Mullen, S. L. Reiner & C. B. Thompson, (2000) Structural analysis of CTLA-4 function in vivo. *J Immunol* **164**: 5319-5327.
- Matsui, Y., M. Inobe, H. Okamoto, S. Chiba, T. Shimizu, A. Kitabatake & T. Uede, (2002) Blockade of T cell costimulatory signals using adenovirus vectors prevents both the induction and the progression of experimental autoimmune myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* **34**: 279-295.
- Maurer, M., S. Loserth, A. Kolb-Maurer, A. Ponath, S. Wiese, N. Kruse & P. Rieckmann, (2002) A polymorphism in the human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) gene (exon 1 +49) alters T-cell activation. *Immunogenetics* **54**: 1-8.
- Mayans, S., K. Lackovic, C. Nyholm, P. Lindgren, K. Ruikka, M. Eliasson, C. M. Cilio & D. Holmberg, (2007) CT60 genotype does not affect CTLA-4 isoform expression despite association to T1D and AITD in northern Sweden. *BMC Med Genet* **8**: 3.
- McCoy, K. D. & G. Le Gros, (1999) The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. *Immunol Cell Biol* **77**: 1-10.
- Mekala, D. J. & T. L. Geiger, (2005) Immunotherapy of autoimmune encephalomyelitis with redirected CD4+CD25+ T lymphocytes. *Blood* **105**: 2090-2092.

- Merrill, J. T., R. Burgos-Vargas, R. Westhovens, A. Chalmers, D. D'Cruz, D. J. Wallace, S. C. Bae, L. Sigal, J. C. Becker, S. Kelly, K. Raghupathi, T. Li, Y. Peng, M. Kinaszczuk & P. Nash, (2010) The efficacy and safety of abatacept in patients with non-life-threatening manifestations of systemic lupus erythematosus: results of a twelve-month, multicenter, exploratory, phase IIb, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* **62**: 3077-3087.
- Mestroni, L., B. Maisch, W. J. McKenna, K. Schwartz, P. Charron, C. Rocco, F. Tesson, A. Richter, A. Wilke & M. Komajda, (1999) Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies. Collaborative Research Group of the European Human and Capital Mobility Project on Familial Dilated Cardiomyopathy. *Eur Heart J* **20**: 93-102.
- Mokyr, M. B., T. Kalinichenko, L. Gorelik & J. A. Bluestone, (1998) Realization of the therapeutic potential of CTLA-4 blockade in low-dose chemotherapy-treated tumor-bearing mice. *Cancer Res* **58**: 5301-5304.
- Moreland, L. W., R. Alten, F. Van den Bosch, T. Appelboom, M. Leon, P. Emery, S. Cohen, M. Luggen, W. Shergy, I. Nuamah & J. C. Becker, (2002) Costimulatory blockade in patients with rheumatoid arthritis: a pilot, dose-finding, double-blind, placebo-controlled clinical trial evaluating CTLA-4Ig and LEA29Y eighty-five days after the first infusion. *Arthritis Rheum* **46**: 1470-1479.
- Morgan, M. E., R. Flierman, L. M. van Duivenvoorde, H. J. Witteveen, W. van Ewijk, J. M. van Laar, R. R. de Vries & R. E. Toes, (2005) Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25+ regulatory T cells. *Arthritis Rheum* **52**: 2212-2221.
- Morimoto, S., (2008) Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies. *Cardiovasc Res* **77**: 659-666.

- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn & H. Erlich, (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273.
- Muro, M., G. Rojas, C. Botella, M. Miras, J. A. Campillo, A. Minguela, F. Sánchez-Bueno, J. Bermejo, P. Ramírez & M. R. Alvarez-López, (2008) CT60 A/G marker of the 3'-UTR of the CTLA4 gene and liver transplant. *Transpl Immunol* **18**: 246-249.
- Nakaseko, C., S. Miyatake, T. Iida, S. Hara, R. Abe, H. Ohno, Y. Saito & T. Saito, (1999) Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) engagement delivers an inhibitory signal through the membrane-proximal region in the absence of the tyrosine motif in the cytoplasmic tail. *J Exp Med* **190**: 765-774.
- Nisticò, L., R. Buzzetti, L. E. Pritchard, B. Van der Auwera, C. Giovannini, E. Bosi, M. T. Larrad, M. S. Rios, C. C. Chow, C. S. Cockram, K. Jacobs, C. Mijovic, S. C. Bain, A. H. Barnett, C. L. Vandewalle, F. Schuit, F. K. Gorus, R. Tosi, P. Pozzilli & J. A. Todd, (1996) The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. *Hum Mol Genet* **5**: 1075-1080.
- O'Day, S. J., O. Hamid & W. J. Urban, (2007) Targeting cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4): a novel strategy for the treatment of melanoma and other malignancies. *Cancer* **110**: 2614-2627.
- Oaks, M. K., K. M. Hallett, R. T. Penwell, E. C. Stauber, S. J. Warren & A. J. Tector, (2000) A native soluble form of CTLA-4. *Cell Immunol* **201**: 144-153.
- Palacios, R., D. Comas, J. Elorza & P. Villoslada, (2008) Genomic regulation of CTLA4 and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **203**: 108-115.
- Pankuweit, S., A. Richter, V. Ruppert & B. Maisch, (2009) [Familial predisposition and microbial etiology in dilated cardiomyopathy]. *Herz* **34**: 110-116.

- Paul, M., S. Zumhagen, B. Stallmeyer, M. Koopmann, T. Spieker & E. Schulze-Bahr, (2009) Genes causing inherited forms of cardiomyopathies. A current compendium. *Herz* **34**: 98-109.
- Pavoni, D. P., L. B. Cerqueira, V. M. Roxo & M. L. Petzl-Erler, (2006) Polymorphism of the promoter region and exon 1 of the CTLA4 gene in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *Braz J Med Biol Res* **39**: 1227-1232.
- Pawlak, E., I. E. Kochanowska, I. Frydecka, M. Kielbiński, S. Potoczek & M. Bilińska, (2005) The soluble CTLA-4 receptor: a new marker in autoimmune diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **53**: 336-341.
- Peggs, K. S., S. A. Quezada, C. A. Chambers, A. J. Korman & J. P. Allison, (2009) Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *J Exp Med* **206**: 1717-1725.
- Peggs, K. S., S. A. Quezada, A. J. Korman & J. P. Allison, (2006) Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* **18**: 206-213.
- Pehlivan, S., F. Ozkinay, S. Alper, H. Onay, E. Yuksel, M. Pehlivan & C. Ozkinay, (2009) Association between IL4 (-590), ACE (I)/(D), CCR5 (Delta32), CTLA4 (+49) and IL1-RN (VNTR in intron 2) gene polymorphisms and vitiligo. *Eur J Dermatol* **19**: 126-128.
- Pentcheva-Hoang, T., J. G. Egen, K. Wojnoonski & J. P. Allison, (2004) B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity* **21**: 401-413.
- Perez, V. L., L. Van Parijs, A. Biuckians, X. X. Zheng, T. B. Strom & A. K. Abbas, (1997) Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity* **6**: 411-417.

- Piras, G., M. Monne, A. Uras, A. Palmas, M. Murineddu, L. Arru, A. Bianchi, A. Calvisi, L. Curreli, E. Gaviano, P. Lai, A. Murgia, G. C. Latte, A. Noli & A. Gabbas, (2005) Genetic analysis of the 2q33 region containing CD28-CTLA4-ICOS genes: association with non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* **129**: 784-790.
- Plenge, R. M., L. Padyukov, E. F. Remmers, S. Purcell, A. T. Lee, E. W. Karlson, F. Wolfe, D. L. Kastner, L. Alfredsson, D. Altshuler, P. K. Gregersen, L. Klareskog & J. D. Rioux, (2005) Replication of putative candidate-gene associations with rheumatoid arthritis in >4,000 samples from North America and Sweden: association of susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. *Am J Hum Genet* **77**: 1044-1060.
- Prahalad, S., J. F. Bohnsack, A. Whiting, B. Clifford, L. B. Jorde, S. L. Guthery, S. D. Thompson, D. N. Glass & M. J. Bamshad, (2008) Lack of association of functional CTLA4 polymorphisms with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* **58**: 2147-2152.
- Pullmann, R., J. Lukác, M. Skerenová, J. Rovensky, J. Hybenová, V. Melus, S. Celec & R. Hyrdel, (1999) Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) dimorphism in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* **17**: 725-729.
- Purohit, S., R. Podolsky, C. Collins, W. Zheng, D. Schatz, A. Muir, D. Hopkins, Y. H. Huang & J. X. She, (2005) Lack of correlation between the levels of soluble cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4) and the CT-60 genotypes. *J Autoimmune Dis* **2**: 8.
- Pérez-García, A., S. Brunet, J. J. Berlanga, M. Tormo, J. Nomdedeu, R. Guardia, J. M. Ribera, I. Heras, A. Llorente, M. Hoyos, J. Esteve, J. Besalduch, J. Bueno, J. Sierra, D. Gallardo & G. c. p. e. e. y. t. d. l. l. agudas, (2009) CTLA-4 genotype and relapse incidence in patients with acute myeloid leukemia in first complete remission after induction chemotherapy. *Leukemia* **23**: 486-491.

- Qureshi, O. S., Y. Zheng, K. Nakamura, K. Attridge, C. Manzotti, E. M. Schmidt, J. Baker, L. E. Jeffery, S. Kaur, Z. Briggs, T. Z. Hou, C. E. Futter, G. Anderson, L. S. Walker & D. M. Sansom, (2011) Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* **332**: 600-603.
- Ramírez-Soriano, A., O. Lao, M. Soldevila, F. Calafell, J. Bertranpetit & D. Comas, (2005) Haplotype tagging efficiency in worldwide populations in CTLA4 gene. *Genes Immun* **6**: 646-657.
- Ribas, A., (2010) Clinical development of the anti-CTLA-4 antibody tremelimumab. *Semin Oncol* **37**: 450-454.
- Ribas, A., D. C. Hanson, D. A. Noe, R. Millham, D. J. Guyot, S. H. Bernstein, P. C. Canniff, A. Sharma & J. Gomez-Navarro, (2007) Tremelimumab (CP-675,206), a cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4 blocking monoclonal antibody in clinical development for patients with cancer. *Oncologist* **12**: 873-883.
- Richardson, P., W. McKenna, M. Bristow, B. Maisch, B. Mautner, J. O'Connell, E. Olsen, G. Thiene, J. Goodwin, I. Gyarfás, I. Martin & P. Nordet, (1996) Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* **93**: 841-842.
- Rodríguez, M. R., A. Núñez-Roldán, F. Aguilar, A. Valenzuela, A. García & M. F. González-Escribano, (2002) Association of the CTLA4 3' untranslated region polymorphism with the susceptibility to rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* **63**: 76-81.
- Rodríguez-Pérez, J. M., J. M. Fragoso, E. Alvarez-León, N. Martínez-Rodríguez, G. J. Gallardo, S. Inés-Real, J. Granados, P. A. Reyes & G. Vargas-Alarcón, (2007) MHC class II genes in Mexican patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Exp Mol Pathol* **82**: 49-52.

- Royal, R. E., C. Levy, K. Turner, A. Mathur, M. Hughes, U. S. Kammula, R. M. Sherry, S. L. Topalian, J. C. Yang, I. Lowy & S. A. Rosenberg, (2010) Phase 2 trial of single agent Ipilimumab (anti-CTLA-4) for locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma. *J Immunother* **33**: 828-833.
- Ruderman, E. M. & R. M. Pope, (2005) The evolving clinical profile of abatacept (CTLA4-Ig): a novel co-stimulatory modulator for the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* **7 Suppl 2**: S21-25.
- Ruderman, E. M. & R. M. Pope, (2006) Drug Insight: abatacept for the treatment of rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* **2**: 654-660.
- Ruppert, V., D. Nolte, T. Aschenbrenner, S. Pankuweit, R. Funck & B. Maisch, (2004) Novel point mutations in the mitochondrial DNA detected in patients with dilated cardiomyopathy by screening the whole mitochondrial genome. *Biochem Biophys Res Commun* **318**: 535-543.
- Sahin, M., A. Gursoy & M. F. Erdogan, (2009) Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 polymorphism in Turkish patients with Hashimoto thyroiditis. *Int J Immunogenet* **36**: 103-106.
- Sakaguchi, S., (2004) Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* **22**: 531-562.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh & M. Toda, (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* **155**: 1151-1164.

- Schmidt, E. M., C. J. Wang, G. A. Ryan, L. E. Clough, O. S. Qureshi, M. Goodall, A. K. Abbas, A. H. Sharpe, D. M. Sansom & L. S. Walker, (2009) Ctla-4 controls regulatory T cell peripheral homeostasis and is required for suppression of pancreatic islet autoimmunity. *J Immunol* **182**: 274-282.
- Schott, E., H. Witt, M. Pascu, F. van Boemmel, V. Weich, A. Bergk, J. Halangk, T. Müller, G. Puhl, B. Wiedenmann & T. Berg, (2007) Association of CTLA4 single nucleotide polymorphisms with viral but not autoimmune liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **19**: 947-951.
- Seko, Y., H. Yagita, K. Okumura, M. Azuma & R. Nagai, (2007) Roles of programmed death-1 (PD-1)/PD-1 ligands pathway in the development of murine acute myocarditis caused by coxsackievirus B3. *Cardiovasc Res* **75**: 158-167.
- Semana, G., R. Gausling, R. A. Jackson & D. A. Hafler, (1999) T cell autoreactivity to proinsulin epitopes in diabetic patients and healthy subjects. *J Autoimmun* **12**: 259-267.
- Struwe, C., (2012) Assoziationsuntersuchung bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie und Polymorphismen im CTLA4-Gen.
- Suppiah, V., I. Alloza, S. Heggarty, A. Goris, B. Dubois, H. Carton & K. Vandebroek, (2005) The CTLA4 +49 A/G*G-CT60*G haplotype is associated with susceptibility to multiple sclerosis in Flanders. *J Neuroimmunol* **164**: 148-153.
- Suppiah, V., C. O'Doherty, S. Heggarty, C. C. Patterson, M. Rooney & K. Vandebroek, (2006) The CTLA4+49A/G and CT60 polymorphisms and chronic inflammatory arthropathies in Northern Ireland. *Exp Mol Pathol* **80**: 141-146.
- Takahashi, M. & A. Kimura, (2010) HLA and CTLA4 polymorphisms may confer a synergistic risk in the susceptibility to Graves' disease. *J Hum Genet* **55**: 323-326.

- Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T. W. Mak & S. Sakaguchi, (2000) Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* **192**: 303-310.
- Tang, H., Y. Zhong, Y. Zhu, F. Zhao, X. Cui & Z. Wang, (2010) Low responder T cell susceptibility to the suppressive function of regulatory T cells in patients with dilated cardiomyopathy. *Heart* **96**: 765-771.
- Tang, Q., E. K. Boden, K. J. Henriksen, H. Bour-Jordan, M. Bi & J. A. Bluestone, (2004a) Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* **34**: 2996-3005.
- Tang, Q., K. J. Henriksen, M. Bi, E. B. Finger, G. Szot, J. Ye, E. L. Masteller, H. McDevitt, M. Bonyhadi & J. A. Bluestone, (2004b) In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* **199**: 1455-1465.
- Taylor, M. R., E. Carniel & L. Mestroni, (2006) Cardiomyopathy, familial dilated. *Orphanet J Rare Dis* **1**: 27.
- Teft, W. A., M. G. Kirchhof & J. Madrenas, (2006) A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol* **24**: 65-97.
- Tivol, E. A., F. Borriello, A. N. Schweitzer, W. P. Lynch, J. A. Bluestone & A. H. Sharpe, (1995) Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* **3**: 541-547.
- Tivol, E. A., A. N. Schweitzer & A. H. Sharpe, (1996) Costimulation and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* **8**: 822-830.

- Torres, B., F. Aguilar, E. Franco, E. Sánchez, J. Sánchez-Román, J. Jiménez Alonso, A. Núñez-Roldán, J. Martín & M. F. González-Escribano, (2004) Association of the CT60 marker of the CTLA4 gene with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **50**: 2211-2215.
- Townsend, S. E., F. W. Su, J. M. Atherton & J. P. Allison, (1994) Specificity and longevity of antitumor immune responses induced by B7-transfected tumors. *Cancer Res* **54**: 6477-6483.
- Ueda, H., J. M. Howson, L. Esposito, J. Heward, H. Snook, G. Chamberlain, D. B. Rainbow, K. M. Hunter, A. N. Smith, G. Di Genova, M. H. Herr, I. Dahlman, F. Payne, D. Smyth, C. Lowe, R. C. Twells, S. Howlett, B. Healy, S. Nutland, H. E. Rance, V. Everett, L. J. Smink, A. C. Lam, H. J. Cordell, N. M. Walker, C. Bordin, J. Hulme, C. Motzo, F. Cucca, J. F. Hess, M. L. Metzker, J. Rogers, S. Gregory, A. Allahabadia, R. Nithiyananthan, E. Tuomilehto-Wolf, J. Tuomilehto, P. Bingley, K. M. Gillespie, D. E. Undlien, K. S. Rønningen, C. Guja, C. Ionescu-Tîrgoviște, D. A. Savage, A. P. Maxwell, D. J. Carson, C. C. Patterson, J. A. Franklyn, D. G. Clayton, L. B. Peterson, L. S. Wicker, J. A. Todd & S. C. Gough, (2003) Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* **423**: 506-511.
- Umemura, T., M. Ota, H. Hamano, Y. Katsuyama, T. Muraki, N. Arakura, S. Kawa & K. Kiyosawa, (2008) Association of autoimmune pancreatitis with cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene polymorphisms in Japanese patients. *Am J Gastroenterol* **103**: 588-594.
- van Belzen, M. J., C. J. Mulder, A. Zhernakova, P. L. Pearson, R. H. Houwen & C. Wijmenga, (2004) CTLA4 +49 A/G and CT60 polymorphisms in Dutch coeliac disease patients. *Eur J Hum Genet* **12**: 782-785.

- van Elsas, A., A. A. Hurwitz & J. P. Allison, (1999) Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J Exp Med* **190**: 355-366.
- Viglietta, V., C. Baecher-Allan, H. L. Weiner & D. A. Hafler, (2004) Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* **199**: 971-979.
- Vyse, T. J. & J. A. Todd, (1996) Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell* **85**: 311-318.
- Walker, E. J., G. M. Hirschfield, C. Xu, Y. Lu, X. Liu, C. Coltescu, K. Wang, W. G. Newman, V. Bykerk, E. C. Keystone, D. Mosher, C. I. Amos, E. J. Heathcote & K. A. Siminovitch, (2009) CTLA4/ICOS gene variants and haplotypes are associated with rheumatoid arthritis and primary biliary cirrhosis in the Canadian population. *Arthritis Rheum* **60**: 931-937.
- Walker, L. S. & A. K. Abbas, (2002) The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol* **2**: 11-19.
- Walunas, T. L. & J. A. Bluestone, (1998) CTLA-4 regulates tolerance induction and T cell differentiation in vivo. *J Immunol* **160**: 3855-3860.
- Walunas, T. L., D. J. Lenschow, C. Y. Bakker, P. S. Linsley, G. J. Freeman, J. M. Green, C. B. Thompson & J. A. Bluestone, (1994) CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* **1**: 405-413.
- Wang, X. B., M. Kakoulidou, R. Giscombe, Q. Qiu, D. Huang, R. Pirskanen & A. K. Lefvert, (2002a) Abnormal expression of CTLA-4 by T cells from patients with myasthenia gravis: effect of an AT-rich gene sequence. *J Neuroimmunol* **130**: 224-232.

- Wang, X. B., X. Zhao, R. Giscombe & A. K. Lefvert, (2002b) A CTLA-4 gene polymorphism at position -318 in the promoter region affects the expression of protein. *Genes Immun* **3**: 233-234.
- Waterhouse, P., J. M. Penninger, E. Timms, A. Wakeham, A. Shahinian, K. P. Lee, C. B. Thompson, H. Griesser & T. W. Mak, (1995) Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science* **270**: 985-988.
- Weng, Y. C., M. J. Wu & W. S. Lin, (2005) CT60 single nucleotide polymorphism of the CTLA-4 gene is associated with susceptibility to Graves' disease in the Taiwanese population. *Ann Clin Lab Sci* **35**: 259-264.
- Westhovens, R., J. M. Kremer, L. W. Moreland, P. Emery, A. S. Russell, T. Li, R. Aranda, J. C. Becker, K. Qi & M. Dougados, (2009) Safety and efficacy of the selective costimulation modulator abatacept in patients with rheumatoid arthritis receiving background methotrexate: a 5-year extended phase IIB study. *J Rheumatol* **36**: 736-742.
- Yang, J., Q. Qin, N. Yan, Y. F. Zhu, C. Li, X. J. Yang, X. Wang, M. Pandey, P. Hou & J. A. Zhang, (2011) CD40 C/T(-1) and CTLA-4 A/G(49) SNPs are associated with autoimmune thyroid diseases in the Chinese population. *Endocrine*.
- Yang, Y. F., J. P. Zou, J. Mu, R. Wijesuriya, S. Ono, T. Walunas, J. Bluestone, H. Fujiwara & T. Hamaoka, (1997) Enhanced induction of antitumor T-cell responses by cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 blockade: the effect is manifested only at the restricted tumor-bearing stages. *Cancer Res* **57**: 4036-4041.
- Zalloua, P. A., A. Abchee, H. Shbaklo, T. G. Zreik, H. Terwedow, G. Halaby & S. T. Azar, (2004) Patients with early onset of type 1 diabetes have significantly higher GG genotype at position 49 of the CTLA4 gene. *Hum Immunol* **65**: 719-724.

- Zhang, L., A. Hu, H. Yuan, L. Cui, G. Miao, X. Yang, L. Wang, J. Liu, X. Liu, S. Wang, Z. Zhang, L. Liu, R. Zhao & Y. Shen, (2008) A missense mutation in the CHRM2 gene is associated with familial dilated cardiomyopathy. *Circ Res* **102**: 1426-1432.
- Zhernakova, A., P. Eerligh, P. Barrera, J. Z. Wesoly, J. Z. Weseloy, T. W. Huizinga, B. O. Roep, C. Wijmenga & B. P. Koeleman, (2005) CTLA4 is differentially associated with autoimmune diseases in the Dutch population. *Hum Genet* **118**: 58-66.
- Zhou, Y., D. Huang, P. L. Paris, C. S. Sauter, K. A. Prock & G. S. Hoffman, (2004) An analysis of CTLA-4 and proinflammatory cytokine genes in Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* **50**: 2645-2650.
- Álvarez-Quiroga, C., C. Abud-Mendoza, L. Doníz-Padilla, A. Juárez-Reyes, A. Monsiváis-Urenda, L. Baranda & R. González-Amaro, (2011) CTLA-4-Ig therapy diminishes the frequency but enhances the function of Treg cells in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol* **31**: 588-595.

8. Anhang

8.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Einteilung der Kardiomyopathien in primäre und sekundäre Formen	1
Abb. 2: Einteilung der primären Kardiomyopathien	2
Abb. 3: Mögliche Entstehung einer dilatativen Kardiomyopathie in drei Schritten	4
Abb. 4: Interaktionen zwischen Antigen-präsentierender Zelle und T-Zelle	9
Abb. 5: Die Funktion von CTLA-4 in T-Effektor-Zellen und Tregs	11
Abb. 6: CTLA-4 im Gleichgewicht des Immunsystems	12
Abb. 7: Hypothetische Entstehung einer Autoimmunerkrankung	14
Abb. 8: Humanes Chromosom 2q33 mit den drei Genen für CD28, CTLA-4 und ICOS.	
Bekannte Polymorphismen des CTLA-4-Gens	15
Abb. 9: Schematische Darstellung des Mutationsnachweises mittels DGGE-Technologie	25
Abb. 10: Gelelektrophorese mit PCR-Produkten des CT60-Polymorphismus	29
Abb. 11: Darstellung des CT60A-PCR-Produkts mit vier Schnittstellen	30
Abb. 12: Basensequenz des CT60G-PCR-Produkts mit drei Schnittstellen	30
Abb. 13: Schematische Darstellung des CT60-RFLP	31
Abb. 14: Gelelektrophorese mit Produkten der RFLP-Analyse des CT60-SNP	31
Abb. 15: Verteilung der Genotypen des CT60-Polymorphismus im DCM-Kollektiv Marburg 1 und in der Kontrollkohorte	32
Abb. 16: Genotypen des CT60-Polymorphismus in der DCM-Kohorte Marburg 2 und im Kontrollkollektiv	33
Abb. 17: Genotypfrequenzen des CT60-Polymorphismus in Berliner DCM-Patienten und gesunden Kontrollpersonen	33
Abb. 18: Zusammenfassung der Genotypfrequenzen des CT60-SNP in der vereinigten Population der DCM-Patienten verglichen mit gesunden Blutspendern	34
Abb. 19: Gegenüberstellung der Genotypverteilungen des CTLA-4-CT60-Polymorphismus der verschiedenen DCM-Gruppen und der Kontrollgruppe	35
Abb. 20: Verteilung der Allele des CT60-Polymorphismus in der DCM-Kohorte Marburg 1 und im Kontrollkollektiv	36
Abb. 21: Allelverteilung des CT60-SNP in der DCM-Kohorte Marburg 2 und in Kontrollen	36

Abb. 22: Darstellung der Allelfrequenz des CT60-Polymorphismus in den Kohorten von Berliner DCM-Patienten und gesunden Kontrollpersonen	37
Abb. 23: Allelhäufigkeit des CT60-SNP bei DCM-Patienten (gesamt) und Kontrollen	38
Abb. 24: Gegenüberstellung der Allelverteilung des CT60-Polymorphismus in den verschiedenen DCM-Gruppen und der Kontrollgruppe	38
Abb. 25: Box-Plot-Diagramme klinischer und hämodynamischer Parameter in Abhängigkeit des CT60-SNP-Genotyps	43
Abb. 26: NYHA-Stadien in Abhängigkeit vom Genotyp des CTLA-4-CT60-SNP	48
Abb. 27: AP-Beschwerden in Abhängigkeit vom Genotyp des CT60-SNP	48
Abb. 28: Abhängigkeit der DCM-Genese vom Genotyp des CT60-SNP	49
Abb. 29: Parvovirus-B19-Nachweis in Abhängigkeit vom Genotyp des CT60-Polymorphismus	50
Abb. 30: Genotypverteilung des CTLA-4-CT60-SNP in DCM-Patienten mit und ohne Immunerkrankung in Prozentangaben	51
Abb. 31: Genotypverteilung des CTLA-4-CT60-SNP in DCM-Patienten mit Immunerkrankung und der Kontrollgruppe	52
Abb. 32: Genotypverteilung des CTLA-4-CT60-SNP in DCM-Patienten ohne Immunerkrankung und dem Kontrollkollektiv	52
Abb. 33: Gelelektrophorese mit PCR-Produkten des +49-Polymorphismus	53
Abb. 34: DGGE mit PCR-Produkten des CTLA-4-+49-Polymorphismus	54
Abb. 35: Genotypverteilung des +49-Polymorphismus in der Kohorte der DCM-Patienten Marburg 2 und in der Kontrollgruppe	55
Abb. 36: Allelverteilung des CTLA-4-+49-Polymorphismus in den Studienkollektiven DCM-Patienten Marburg 2 und gesunde Kontrollen	56
Abb. 37: Box-Plot-Diagramme klinischer und hämodynamischer Variablen in Abhängigkeit des +49-SNP-Genotyps	60
Abb. 38: NYHA-Stadien in Abhängigkeit vom Genotyp des CTLA-4-+49-SNP	65
Abb. 39: Angina-pectoris-Beschwerden in Abhängigkeit vom Genotyp des +49-SNP	66
Abb. 40: Abhängigkeit der DCM-Genese (familiär/nicht-familiär) vom Genotyp des CTLA-4-+49-Polymorphismus innerhalb des Marburger DCM-Kollektivs	67
Abb. 41: Parvovirus-B19-Nachweis in Abhängigkeit vom Genotyp des +49-SNP	68
Abb. 42: Genotypverteilung des CTLA-4-+49-Polymorphismus in DCM-Patienten mit und ohne Immunerkrankung	69
Abb. 43: Genotypverteilung des CTLA-4-+49-SNP in DCM-Patienten mit Immunerkrankung und in der Kontrollkohorte	70
Abb. 44: Genotypfrequenz des CTLA-4-+49-SNP in DCM-Patienten ohne Immunerkrankung und in der Kontrollkohorte	71

Abb. 45: Inhibition der T-Zell-Kostimulation durch den CTLA-4-Antikörper Abatacept 91

8.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Herzinsuffizienz nach der NYHA-Klassifikation der New York Heart Association 1994	3
Tabelle 2: Komponenten des PCR-Ansatzes für den Master-Mix	22
Tabelle 3: PCR-Zyklen	23
Tabelle 4: DGGE-Lösungen	26
Tabelle 5: Restriktionsverdau-Ansatz	27
Tabelle 6: Verteilung der Genotypen des CTLA-4-CT60-Polymorphismus	32
Tabelle 7: Allelfrequenzen des CTLA-4-CT60-Polymorphismus	35
Tabelle 8: Klinische und kardiale Parameter des Marburger DCM-Kollektivs in Bezug auf die Genotypen des CT60-SNP	40
Tabelle 9: Ergebnisse des Kolmogorov-Smirnov-Tests für den CT60-SNP	41
Tabelle 10: ANOVA-Test der normalverteilten Variablen des CT60-SNP	44
Tabelle 11: Tukey-Test der normalverteilten Variablen des CTLA-4-CT60-SNP	45
Tabelle 12: Kruskal-Wallis-Test der nicht normalverteilten Variablen des CT60-SNP	46
Tabelle 13: Kardiologische Variablen des Marburger DCM-Kollektivs in Bezug auf die Genotypen des CT60-SNP	47
Tabelle 14: Genotypverteilung des CT60-Polymorphismus in Abhängigkeit zum Vorliegen einer Immunerkrankung bei DCM-Patienten	51
Tabelle 15: Verteilung der Genotypen des CTLA-4-+49-Polymorphismus	54
Tabelle 16: Allelfrequenzen des +49-Polymorphismus	55
Tabelle 17: Charakterisierung der Gruppe DCM-Patienten Marburg 1 in Bezug auf die Genotypen des CTLA-4-+49-SNP	58
Tabelle 18: Ergebnisse des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests für den +49-SNP	59
Tabelle 19: ANOVA-Test der Variablen des CTLA-4-+49-SNP	61
Tabelle 20: Tukey-Test des CTLA-4-+49-SNP	63
Tabelle 21: Kardiale Parameter des Marburger DCM-Kollektivs in Bezug auf die Genotypen des CTLA-4-+49-SNP	65
Tabelle 22: Genotypverteilung des CTLA-4-+49-Polymorphismus in Abhängigkeit zum Vorliegen einer Immunerkrankung bei DCM-Patienten	69

8.3. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AICD	Aktivierungs-induzierter Zelltod
AK	Antikörper
ANOVA	Varianzanalyse (engl.: analysis of variance)
AP	Angina pectoris
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
ARVCM	arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CCS	Canadian Cardiovascular Society
cM	Centimorgan
CTLA4	cytotoxisches Antigen 4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4)
DCM	dilatative Kardiomyopathie (Dilatative Cardiomyopathy)
df	Freiheitsgrad
DGGE	denaturierende Gradientengelelektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphate
EAE	experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis
EAM	experimentelle Autoimmunmyokarditis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Auswurfraction (ejection fraction)
EKG	Elektrokardiogramm
et al.	et alteri, und andere
flCTLA-4	full-length CTLA-4
g	Gramm
G	Guanin
HCM	hypertrophe Kardiomyopathie
HF	Herzfrequenz
HLA	Hauptleukozytenantigene (Human Leucocyte Antigen)
htSNP	haplotype-tagging Single Nucleotide Polymorphism
ICOS	induzierbarer T-Zell Kostimulator

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobasenpaar(e)
KHK	koronare Herzerkrankung
LD	Kopplungsungleichgewicht (engl.: Linkage disequilibrium)
LE	Lupus erythematoses
LV	linker Ventrikel
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
M	Molar
MHC	Major Histocompatibility Complex
mM	Millimolar
ml	Milliliter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MS	Multiple Sklerose
MW	Mittelwert
n/N	Anzahl (engl.: number)
NKCM	nichtklassifizierbare Kardiomyopathie
NYHA	New York Heart Association
PB19	Parvovirus-B19
PBC	primär biliäre Zirrhose
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PD-L	Programmed death-ligand
Primer F	Vorwärtsprimer
Primer R	Rückwärtsprimer
RA	rheumatoide Arthritis
RCM	restriktive Kardiomyopathie
RFLP	Restriktionfragmentlängenpolymorphismus
sCTLA-4	lösliches CTLA-4 (engl.: soluble CTLA-4)
SD	Standardabweichung
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SVV	Small vessel vasculitis
T	Thymin
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin

TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
Treg	T-regulatorische Zelle/regulatorische T-Zelle
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
u	Unit
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
vs.	versus, gegen
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
z.B.	zum Beispiel

8.4. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren in Marburg: Aigner, Alter, Aumüller, Aust, Barth, Basler, Baum, Baumann, Bartsch, Bepler, Bien, Brendel, Burbelko, Burchert, Cetin, Czyubayco, Daut, Del Rey, Donner-Banzhoff, Eberhart, Fendrich, Feuser, Figiel, Frank, Fuchs-Winkelmann, Gebhardt, Geks, Görg C., Görg K., Gress, Grimm, Hasilik, Hegele, Hertl, Heverhagen, Höffken, Hoffmann, Hofmann, Holland, Hoyer, Hundt, Jacob, Jerrentrup, Kalmbach, Kann, Kaufmann, Kill, Klose, Köhler, König, Kohlmann, Kratz, Krüger, Kroh, Kühnert, Kuhn, Kwee, Langer, Lemke, Leonhardt, Lill, Lohoff, Maier, Maisch, Mandic, McGregor, Mennel, Meyer, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Nachtigall, Neubauer, Kanngießer, Oertel, Olbert, Pagenstecher, Pankuweit, Pega, Petermann, Ramaswamy, Renz, Richter, Röhm, Röper, Rolfes, Rost, Rothmund, Rüsch, Ruppert, Sattler, Schäfer, Schlosser, Schmidt, Schofer, Schoppet, Schrader, Schu, Seitz, Sesterhenn, Steinfeld, Steiniger, Steinkamp, Stempel, Ruchholz, Torossian, Vassilou, Vogelmeier, Vogt, Wagenknecht, Wagner, Waldegger, Walthers, Weihe, Werner, Westermann, Wündisch, Wulf.

8.5. Publikation

Teilergebnisse aus dieser Dissertationsschrift wurden veröffentlicht in:

Volker Ruppert, Thomas Meyer, Clarissa Struwe, Jana Petersen, Andreas Perrot, Maximilian G Posch, Cemil Ozcelik, Anette Richter, Bernhard Maisch and Sabine Pankuweit on behalf of the German Heart Failure Network. Evidence for CTLA4 as a susceptibility gene for dilated cardiomyopathy. European Journal of Human Genetics (2010) 18, 694–699 & 2010 Macmillan Publishers Limited 1018-4813/10

8.6. Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. med. B. Maisch für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in seiner Klinik anzufertigen.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. mult. Thomas Meyer danke ich herzlich für die ausgezeichnete Betreuung. Obwohl er gegen Ende der Arbeit nicht mehr in Marburg war, konnte ich mir, besonders während der schriftlichen Ausarbeitung, seiner geduldigen und gewissenhaften Unterstützung stets sicher sein.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Volker Ruppert möchte ich mich für die erstklassige Betreuung vom ersten Tag im Labor bis zur Fertigstellung der letzten Seiten dieser Arbeit bedanken. Ohne seine zahlreichen Hilfestellungen und Ratschläge wäre diese Dissertation wahrscheinlich noch immer nicht fertig.

Auch meine Doktorarbeitskollegen Julia, Verena, Jan, Sarah, Fabian und Ricardo haben mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden, wenn ich mal nicht weiter wusste. Vielen dank für eure Geduld!

Meinen Freundinnen Lena, Sarah und Antje danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Sabrina und Antje möchte ich dafür danken, dass sie mir mit ihren weitreichenden Word-Kenntnissen das Leben so sehr vereinfacht haben. Mein besonderer Dank gilt noch meiner Mitbewohnerin Valery, die mir während dem Schreiben dieser Arbeit immer voller Geduld zugehört hat und mit mir so manche Schreibblockade überwunden hat.

Nicht genug danken kann ich meinen Eltern Angelika und Ralph, die mich während meines gesamten Lebens auf jegliche Art und Weise unterstützt haben und mir so das Medizinstudium und diese Dissertation, mit allen Extras, ermöglicht haben.